

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 757**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7028** (2006.01)

**A61K 38/47** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2013 PCT/US2013/049248**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14008353**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2013 E 13813686 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2849737**

54 Título: **Composiciones que incluyen sulforafano o un precursor de sulforafano y un extracto o polvo de setas**

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:  
**23.04.2020**

73 Titular/es:

**NUTRAMAX 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 2 755 757 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 incluyen sulforafano o un precursor de sulforafano y un extracto o polvo de setas

## 5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con la combinación de un precursor de sulforafano que comprende glucorafanina, una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano en sulforafano que comprende una glucosidasa, preferiblemente una tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa, un potenciador enzimático que comprende ácido ascórbico y un extracto o polvo de seta (preferiblemente maitake, shiitake, y/o seta reishi). La presente invención se relaciona con una composición relacionada con esta combinación, y que puede comprender extracto o polvo de brócoli. La presente invención también se relaciona con una composición como se describió anteriormente para su uso como medicamento, para su uso para tratar, prevenir, reducir la incidencia de, disminuir los síntomas asociados con y reducir las recurrencias secundarias de cáncer de mama. Se divulga la combinación de un extracto o polvo de brócoli y un extracto o polvo de seta (preferiblemente maitake, shiitake o seta de reishi).

## Antecedentes de la invención

El uso de productos naturales se está volviendo cada vez más popular entre los humanos y los animales de compañía. Algunos de estos productos naturales se están incorporando en suplementos dietéticos y alimentos médicos. Existe la necesidad en la técnica de suplementos que sean útiles como agentes quimioprotectores y/o antioxidantes. Además, existe una necesidad en la técnica de composiciones farmacéuticas y suplementos dietéticos que sean útiles para afecciones y trastornos asociados con la mama.

La quimioprotección mediante el uso de productos naturales está evolucionando como un medio seguro, efectivo, económico, de fácil acceso y práctico para prevenir o reducir la incidencia de muchas afecciones que afectan a los humanos y a los animales domésticos. Se sabe que los carcinógenos que pueden dañar las células a nivel molecular a menudo se ingieren e inhalan como precursores no tóxicos. Estos precursores no tóxicos pueden convertirse en sustancias cancerígenas en el cuerpo. Los agentes quimioprotectores, como las sustancias naturales que pueden activar enzimas destoxificantes o sus cofactores, pueden contrarrestar y permitir la eliminación o potenciar las otras defensas existentes de manera natural, como el sistema inmunitario.

Algunos productos naturales tienen actividad antioxidante. El estrés oxidativo juega un papel importante en el envejecimiento, la progresión de enfermedades neurodegenerativas, así como el trauma fisiológico, como la isquemia. Los agentes antioxidantes pueden reducir o inhibir la oxidación de biomoléculas vitales y pueden desempeñar un papel en el tratamiento, prevención o reducción de la incidencia de cáncer, enfermedad coronaria cardíaca, accidente cerebrovascular y enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Alzheimer, demencia y accidente cerebrovascular, son ejemplos de afecciones impactadas por estrés oxidativo.

Se cree que los cánceres son en gran medida consecuencia de la exposición a desafíos ambientales, ya sea desde adentro (es decir, hormonas de estrógenos, progesterona) o externamente (es decir, bisfenol A (BPA) del plástico) y la inflamación crónica. Afortunadamente, el daño de los desafíos ambientales se puede negar a través de una red compleja de enzimas quimioprotectoras de fase II que se encuentran en muchos tipos de células de nuestro cuerpo. Es bien sabido que los estrógenos y sus metabolitos pueden conducir a la proliferación de tejido mamario y tumores. Peor aún, los metabolitos de quinona del estrógeno tienen la capacidad de ingresar al tejido mamario y migrar al núcleo de las células epiteliales ductales y glandulares. Allí, se enlazan al ADN formando aductos de ADN de quinona de estrógenos que conducen a mutaciones corriente abajo. Se cree que estas mutaciones son responsables de la base misma de un tumor: el inicio del cáncer. Afortunadamente, una enzima de fase II particular, NAD(P)H:quinona oxidoreductasa (NQO1) puede tomar quinona de estrógenos peligrosas y altamente reactivas y metabolizarlas a químicos inertes que pueden eliminarse fácilmente del cuerpo. Por lo tanto, un mecanismo importante para disminuir la incidencia de cáncer es inducir enzimas protectoras de Fase II que incluyen NQO1. El aumento de los niveles de NQO1 puede ser eficaz en el tratamiento, prevención, reparación, reducción de la incidencia y disminución de los síntomas asociados con cualquier condición que resulte de los altos niveles de quinona de estrógenos. Los ejemplos de quinona de estrógenos incluyen, pero no limitándose a, quinonas catecol de estrógeno. Las quinonas de estrógenos se describen en las siguientes referencias: Nutter et al. *Chem Res Toxicol*, 1994, 7:23-28; Cavalieri et al. *Ann N Y Acad Sci*, 2006; 1089:286-301; Bolton et al. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(1):93-101; and Cavalieri et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1766:63-78.

Un ejemplo de un producto natural que se cree que tiene propiedades quimioprotectoras y antioxidantes es el sulforafano. El sulforafano es un compuesto de organosulfuro que también se conoce como 1-isotiocianato-4-metilsulfonilbutano. El precursor del sulforafano, la glucorafanina, se puede obtener de vegetales de la familia Brassicaceae, como el brócoli, las coles de bruselas y el repollo. Sin embargo, se deben consumir grandes cantidades de vegetales para obtener niveles adecuados para la quimioprevención. La glucorafanina se convierte en sulforafano mediante una enzima tioglucosidasa llamada mirosinasa, que ocurre en una variedad de fuentes exógenas como las verduras Brassicaceae y endógenamente en la microflora intestinal. Sin embargo, tras la ingestión de glucorafanina, no todos los animales son capaces de lograr su conversión a sulforafano, probablemente debido a las variaciones en

- 5 las poblaciones de microflora y la salud general. Además, en ambientes ácidos como el estómago, la glucorafanina se puede convertir en metabolitos inertes. El metabolito activo, el sulforafano, induce un factor relacionado con el eritroide 2 nuclear (Nrf2) que, a su vez, sobrerregula la producción de enzimas de detoxificación de Fase II y enzimas citoprotectoras como glutatión S-transferasas, NAD(P)H:quinona oxidoreductasa (NQO1) y hemo-oxigenasa-1 (HO-1). Se ha pensado que el sulforafano induce la producción de estas enzimas sin cambiar significativamente la síntesis de las enzimas del citocromo P-450. Se cree que la sobrerregulación de las enzimas de fase II desempeña un papel en una variedad de actividades biológicas, incluida la protección del cerebro contra la citotoxicidad, la protección del hígado contra los efectos tóxicos de la acumulación de grasa y la detoxificación de una variedad de otros tejidos.
- 10 El sulforafano y su precursor glucorafanina se han estudiado ampliamente. et al. (Nutrition and Cancer, (2006), Vol. 55(1), pp. 53-62) discuten un estudio clínico de Fase I que determina la seguridad, tolerabilidad y metabolismo de los glucosinolatos e isotiocianatos de brotes de brócoli. Shapiro et al. discuten un estudio clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de extractos de brotes que contengan glucosinolatos como glucorafanina o isotiocianatos como sulforafano en sujetos humanos sanos. El estudio encontró que la administración de estas sustancias no produjo efectos adversos sistemáticos, clínicamente significativos. Ye et al., (Clinica Chimica Acta, 200, 316:43-53) discuten la farmacocinética de los isotiocianatos de brotes de brócoli en humanos.
- 15 Se han utilizado o estudiado varias setas por sus efectos medicinales. Se cree que estas "setas medicinales" tienen propiedades beneficiosas, como actividad antiviral, antimicrobiana, anticancerígena, antihiperglucémica y/o antiinflamatoria. Los ejemplos de setas medicinales incluyen maitake, shiitake, reishi, cremini, almendra, castaña, oreja de madera, oreja de nube, porcini, capuchón de tinta, yarta gunbu, enokitake, shemeji, leche de tigre, morel, bambú, ostra dorada, ostra rosa, ostra rey, hiratake, coliflor, gelatina blanca, gelatina de oro, matsutake, trufa mexicana y setas de paja.
- 20 Las setas Maitake (*Grifola frondosa*) son setas comestibles que se consumen ampliamente como alimento y se usan en la medicina tradicional para mejorar la función inmune y tratar el cáncer. Se cree que las setas Maitake, que contienen glucanos, tienen propiedades beneficiosas, como efectos antitumorales e inmunomoduladores. Existen extractos estandarizados de seta maitake que contienen como ingredientes activos glucanos, como los beta-glucanos enlazados a proteínas. El beta 1,6-glucano, un polisacárido enlazado a proteínas, se ha identificado como un componente activo en las setas maitake. Se ha demostrado que las setas Maitake tienen efectos antitumorales, inhibiendo la metástasis tumoral in vitro. En un estudio, se observó regresión tumoral o mejoras significativas en los síntomas en la mitad de los sujetos que usaron extracto de maitake. En un estudio de pacientes con cáncer de mama posmenopáusico, se demostró que la administración oral de extracto de maitake tiene efectos inmunomoduladores.
- 25 Las setas shiitake (*Lentinula edodes*) son setas comestibles nativas del este de Asia. Las setas shiitake contienen micoquímicos, que se postula que tienen efectos antivirales, antibióticos, antiinflamatorios, antihipertensivos y anticancerígenos. Se cree que esto se debe en gran medida a los glucanos, tanto los glucanos alfa como los beta. Algunos extractos de setas shiitake tienen un contenido de alfa glucano superior al 40 %. Además, el lentinan (1,3 beta-D-glucano), un polisacárido aislado del shiitake, ha sido bien estudiado y se cree que juega un papel en los efectos beneficiosos del shiitake. Se ha demostrado que tiene efectos anticancerígenos en las células de cáncer de colon, lo que puede deberse a su capacidad para suprimir las enzimas 1A del citocromo P450 que se sabe que metabolizan los procarcinógenos en formas activas. La lentina, el componente proteico, tiene fuertes propiedades antifúngicas y se ha encontrado que inhibe la proliferación de células leucémicas y suprime la actividad de la transcriptasa inversa 1 del virus de inmunodeficiencia humana.
- 30 Las setas reishi (*Ganoderma lucidum*), también conocidos como setas lingzhi, son setas comestibles que se encuentran en el este de Asia. Se cree que las setas reishi tienen efectos antitumorales, anticancerígenos, inmunomoduladores e inmunoterapéuticos. Las setas reishi tienen una serie de componentes que se cree que contribuyen a su actividad, incluido el glucano, como el beta-glucano, cantaxantina, esteroides, cumarina, ácido ganodérico y manitol.
- 35 La levadura de cerveza (*Saccaromyces cerevisiae*) puede ser una fuente de glucanos, en particular, beta-glucanos. Los componentes activos de la levadura de cerveza se pueden extraer de varias maneras, como los métodos descritos en Bacon et al. *Biochem J*, 1969, 114(3): 557-567, Patente de Estados Unidos No. 7,803,605; Patente de Estados Unidos No. 5,702,719; y Patente de Estados Unidos No. 8,323,644.
- 40 Los glucanos se describen en las siguientes referencias: Vetvicka et al. *Endocr Metab Immun Disord Drug Targets*, 2009, 9(1):67-75, y Vetvicka et al. *J Med Food*, 2008: 11(4): 615-622.
- 45 Zhang et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1994), Vol. 91, pp. 3147-3150) discute un estudio en ratas Sprague-Dawley para determinar las actividades anticancerígenas del sulforafano y los isotiocianatos de norbornilo sintéticos relacionados estructuralmente. El estudio determinó que la administración de sulforafano fue efectiva para bloquear la formación de tumores mamarios.
- 50 Cornblatt et al. (*Carcinogenesis*, (2007), Vol. 38(7): pp. 1485-1490) discute un estudio en ratas Sprague-Dawley para determinar el efecto del sulforafano en la quimioprevención en la mama. El estudio determinó que la administración

oral de sulforafano resultó en un aumento de 3 veces en la actividad enzimática de NAD(P)H: quinona oxidoreductasa (NQO1) y una inmunotinción elevada 4 veces de la enzima hemo oxigenasa-1 (HO-1) en el epitelio mamario.

5 Munday et al. (Cancer Res, (2008), Vol. 68(5): pp. 1593-1600) discute un estudio sobre los efectos de un extracto acuoso liofilizado de brotes de brócoli en el desarrollo del cáncer de vejiga en ratas. El estudio encontró que la administración del extracto de brotes de brócoli resultó en una inducción significativa de glutatión S-transferasa y NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 en la vejiga, que son enzimas que tienen actividad protectora contra oxidantes y carcinógenos.

10 Fang et al. (J Altern Complem Med, (2006), Vol. 12(2): pp. 125-132) divulga un estudio que determina el efecto antiproliferativo de una fracción de acetato de etilo de setas shiitake en líneas celulares de carcinoma de mama humano (MDA-MB-453 y MCF-7), una línea celular epitelial de mama no maligna humana (MCF-10F) y dos líneas celulares de mieloma (RPMI08226 e IM-9). El estudio encontró que la inhibición del crecimiento de las células tumorales por los componentes en las setas shiitake puede ser el resultado de la inducción de apoptosis.

15 Kim et al. (J Med Food, (2007), Vol. 10(1): pp. 25-31) divulga un estudio que investiga la activación de células asesinas naturales (NK) y los efectos anticancerígenos de un exo-biopolímero de salvado de arroz cultivado de Lentinus edodes. El estudio encontró que el exo-biopolímero puede ser efectivo para prevenir y/o tratar el cáncer a través de la activación natural de las células asesinas.

20 Louie et al. (BJUI, (2009), Vol. 153(9): pp. 1215-1221) discute el efecto sinérgico de la combinación de interferón-a y fracción D de la seta maitake (PDF), un extracto de seta bioactivo sobre la actividad anticancerígena del interferón-a en células T24 de cáncer de vejiga in vitro.

25 Masuda et al. (Biol. Pharm. Bull. (2008), Vol. 31(6): pp. 1104-1108) discute un estudio que evalúa la actividad antimetastásica de una fracción de setas maitake en un modelo murino de metástasis pulmonar. El estudio encontró que la fracción inhibía la metástasis tumoral mediante la activación de las células asesinas naturales y las células presentadoras de antígeno (APC) y la supresión de las moléculas de adhesión como ICAM-1, lo que conduce a la inhibición de la adhesión de las células tumorales a las células endoteliales vasculares.

30 La Solicitud de Patente Europea No. 2 213 280 divulga formulaciones que comprenden glucosinolatos tales como glucorafanina y mirosinasa, en donde la formulación está encapsulada o recubierta.

Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona una composición que comprende: (i) un precursor de sulforafano que es glucorafanina; (ii) una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano en sulforafano que es una enzima glucosidasa, preferiblemente una enzima tioglucosidasa, y más preferiblemente mirosinasa; (iii) un potenciador enzimático que es ácido ascórbico; y (iv) un extracto o polvo de seta (preferiblemente maitake, shiitake o seta reishi).

40 La presente invención proporciona una composición como se describe anteriormente, y que puede comprender extracto o polvo de brócoli. La presente invención también proporciona una composición como la descrita anteriormente para su uso como medicamento, para su uso en el tratamiento, prevención, reducción de la incidencia de, disminución de los síntomas asociados con y reducción de las recurrencias secundarias de cáncer de mama. Se divulga un método para tratar, prevenir, reducir la incidencia de, disminuir los síntomas asociados con y/o reducir las recurrencias secundarias de cáncer, en particular cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer de vejiga en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) un precursor de sulforafano, (ii) una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano en sulforafano, (iii) un potenciador enzimático y (iv) un extracto o polvo de seta (preferiblemente maitake, shiitake o seta reishi). También se divulga un método para aumentar los niveles o aumentar la expresión génica de NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO-1) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) glucorafanina, (ii) glucosidasa, preferiblemente tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa, (iii) ácido ascórbico, y (iv) un extracto o polvo de seta (preferiblemente maitake, shiitake o seta reishi). También se divulga un método para tratar, prevenir, reducir la incidencia de, disminuir los síntomas asociados con, y/o reducir las recurrencias secundarias de una enfermedad o afección asociada con niveles elevados de quinona de estrógeno, que comprende administrar al sujeto: (i) glucorafanina, (ii) glucosidasa, preferiblemente tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa, (iii) ácido ascórbico y (iv) un extracto o polvo de seta (preferiblemente maitake, shiitake o seta reishi).

55 Se divulga una composición que comprende: (i) un extracto o polvo de brócoli, y (ii) un extracto o polvo de seta (preferiblemente maitake, shiitake o seta reishi). Se divulga un método para tratar, prevenir, reducir la incidencia de, disminuir los síntomas asociados con y/o reducir las recurrencias secundarias de cáncer, en particular cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer de vejiga en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) un extracto o polvo de brócoli, y (ii) un extracto o polvo de seta (preferiblemente maitake, shiitake o seta reishi). También se divulga un método para aumentar los niveles o aumentar la expresión génica de NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO -1) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) un extracto o polvo de brócoli, y (ii) un extracto o polvo de seta (preferiblemente maitake, shiitake o seta reishi). También se divulga un método para tratar, prevenir, reducir la incidencia de, disminuir los síntomas asociados con, y/o reducir las

recurrencias secundarias de una enfermedad o condición asociada con niveles elevados de quinona de estrógeno, que comprende administrar al sujeto: (i) un extracto de brócoli o polvo, y (ii) un extracto o polvo de seta (preferiblemente maitake, shiitake o seta reishi).

5 Breve descripción de las figuras

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

10 La figura 2 es un gráfico 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 un gráfico que muestra la conversión a sulforafano en 30 minutos a 38 °C y ácido ascórbico 1 mM, como se describe en el Ejemplo 4.

15 La figura 4 es un gráfico que muestra la conversión de glucorafanina a sulforafano en fluido intestinal simulado, como se describe en el Ejemplo 5.

La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 6.

20 La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 7.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se relaciona con la combinación de un precursor de sulforafano que es glucorafanina, una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano en sulforafano que es glucosidasa, preferiblemente una tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa, un potenciador enzimático que es ácido ascórbico y una seta (tal como extracto o polvo de maitake, shiitake o seta reishi). La presente invención proporciona una composición relacionada con esta combinación, y que puede comprender extracto o polvo de brócoli. La presente invención también proporciona una composición como la descrita anteriormente para su uso como medicamento, para su uso en el tratamiento, prevención, reducción de la incidencia de, disminución de los síntomas asociados con y reducción de las recurrencias secundarias de cáncer de mama. Se divulga una combinación de un extracto o polvo de brócoli y un extracto o polvo de setas maitake, shiitake o reishi. También se divulga el uso de un extracto o polvo de setas, con una mezcla de uno o más de los siguientes: precursor de sulforafano y extracto de brócoli. Se divulgan composiciones relacionadas con estas combinaciones.

30

35

Se divulgan métodos que comprenden administrar estas combinaciones. En algunas realizaciones, la combinación puede administrarse para tratar, prevenir, reducir la incidencia de, disminuir los síntomas asociados con, y/o reducir las recurrencias secundarias de cáncer, en particular cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer de vejiga en un sujeto, que comprende administrar al sujeto. En algunas realizaciones, la combinación se puede administrar para aumentar los niveles o aumentar la expresión génica de NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO-1) en un sujeto. En algunas realizaciones, la combinación puede administrarse para tratar, prevenir, reducir la incidencia de, disminuir los síntomas asociados con, y/o reducir las recurrencias secundarias de una enfermedad o afección asociada con niveles elevados de quinona de estrógeno.

40

45

El sulforafano también se conoce como 1-isotiocianato-4-metilsulfínilbutano. Los derivados del sulforafano incluyen pero no limitándose a análogos de sulfoxitiocarbamato de sulforafano, 6-metilsulfínilhexil isotiocianato (6-HITC) y compuestos que comprenden la estructura del sulforafano con diferentes cadenas laterales y/o diversas longitudes de espaciadores entre los grupos isotiocianato y sulfóxido. Los ejemplos de derivados de sulforafano incluyen los descritos en las siguientes referencias: Hu et al., Eur J Med Chem, 2013, 64:529-539; Ahn et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(21):9590-9595; y Morimistu et al., J. Biol. Chem. 2002, 277:3456-3463, y Baird et al., Arch Toxicol, 2011, 85(4):241-272.

50

El término "precursor de sulforafano" se refiere a cualquier compuesto, sustancia o material que pueda usarse para producir sulforafano. En la presente invención, el precursor de sulforafano comprende glucorafanina que puede convertirse o metabolizarse en sulforafano, preferiblemente mediante una enzima. La glucorafanina es un glucosinolato que también se conoce como 4-metilsulfínilbutil glucosinolato y 1-S-[(1E)-5-(metilsulfínil)-N-(sulfonatooxi)pentanimidoil]-1-tio-β-D-glucopiranososa.

55

En algunas realizaciones, la composición de la presente invención comprende aproximadamente 1 pg a aproximadamente 10 g, preferiblemente aproximadamente 250 μg a aproximadamente 5 g, más preferiblemente aproximadamente 500 pg a aproximadamente 2.000 mg, incluso más preferiblemente aproximadamente 1 mg a aproximadamente 750 mg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.5 mg a aproximadamente 250 mg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 100 mg, y lo más preferible de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 75 mg de preferiblemente glucorafanina. En algunas realizaciones, las

60

65

composiciones adecuadas para uso humano comprenden de aproximadamente 3.5 mg a aproximadamente 50 mg de glucorafanina.

5 Se divulga un método que comprende administrar glucorafanina a un sujeto, en una cantidad de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 10 g, preferiblemente de aproximadamente 250 pg a aproximadamente 5 g, más preferiblemente de aproximadamente 500 pg a aproximadamente 2.000 mg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 750 mg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.5 mg a aproximadamente 250 mg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 100 mg, y lo más preferible de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 75 mg. También se divulga el método adecuado para uso humano que comprende la administración de aproximadamente 3.5 mg a aproximadamente 50 mg. Se divulga un método que comprende administrar una cantidad de glucorafanina a un sujeto en una cantidad de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1.000 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 5 µg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 7.5 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, y lo más preferible de aproximadamente 25 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Se divulga el método adecuado para uso humano que comprende la administración de aproximadamente 50 µg/kg a aproximadamente 800 µg/kg. Las cantidades anteriores pueden referirse a cada administración de dosificación o una dosificación diaria total.

20 Se divulga un método que comprende la administración de más de un precursor de sulforafano. En algunas realizaciones, la composición comprende más que precursor de sulforafano. En algunas realizaciones en donde el método o composición comprende más de un precursor de sulforafano, las cantidades anteriores pueden referirse a la cantidad de cada precursor de sulforafano, o la cantidad total de los precursores de sulforafano.

25 El precursor de sulforafano que es glucorafanina puede convertirse o metabolizarse en sulforafano, preferiblemente por una enzima. En la presente invención, la enzima capaz de convertir la glucorafanina en sulforafano comprende una enzima glucosidasa, preferiblemente una enzima tioglucosidasa, y más preferiblemente mirosinasa. La mirosinasa también se conoce como tioglucósido glucohidrolasa.

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

35 Se divulga un método que comprende administrar la glucosidasa, preferiblemente la tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa, en una cantidad de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 1 µg, preferiblemente de aproximadamente 50 pg a aproximadamente 500 ng, y lo más preferible de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 150 ng. En algunas realizaciones en donde el sujeto es un ser humano, el método comprende la administración de aproximadamente 5 ng a aproximadamente 75 ng de la glucosidasa, preferiblemente la tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa. En algunas realizaciones, el método comprende administrar la glucosidasa, preferiblemente la tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa a un sujeto en una cantidad de aproximadamente 0.02 pg/kg a aproximadamente 0.02 ug/kg, preferiblemente aproximadamente 0.7 pg/kg a aproximadamente 7 ng/kg, y lo más preferible de aproximadamente 0.02 ng/kg a aproximadamente 2 ng/kg. En algunas realizaciones preferidas en donde el sujeto es un humano, el método comprende la administración de aproximadamente 0.1 ng/kg a aproximadamente 1 ng/kg. Las cantidades anteriores pueden referirse a cada administración de dosificación o una dosificación diaria total.

50 Se divulga un método que comprende la administración de más de una glucosidasa capaz de convertir glucorafanina en sulforafano. También se divulga una composición que comprende más de una glucosidasa capaz de convertir glucorafanina en sulforafano. En algunas realizaciones en donde los métodos o composiciones comprenden más de una glucosidasa, las cantidades anteriores pueden referirse a la cantidad de cada enzima, o la cantidad total de las enzimas.

55 La presente invención también proporciona el uso de un extracto y/o polvo de brócoli, incluyendo pero no limitándose a extractos y polvos de semillas y brotes de brócoli. Se divulgan métodos de 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 está estandarizado para contener aproximadamente 1 % a aproximadamente 75 % p/p, más preferiblemente aproximadamente 2.5 % a aproximadamente 50 %, incluso más preferiblemente aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 %, y lo más preferible aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 % de glucorafanina. Los ejemplos de extractos y polvos de brócoli incluyendo, pero no limitándose a los descritos en las patentes de los Estados Unidos Nos. 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, mediante secado al aire, liofilización, secado en tambor, secado por aspersion, secado por calor y/o secado parcial al vacío de brócoli, preferiblemente brotes de brócoli. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden el uso de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 g, más preferiblemente de aproximadamente 250 pg a aproximadamente 5 g, incluso más preferiblemente de aproximadamente 500 pg a aproximadamente 1 g,

preferiblemente de aproximadamente 600 µg a aproximadamente 500 mg, más preferiblemente de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 400 mg, y lo más preferible 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 descritas anteriormente. En la presente invención, la composición comprende además un potenciador enzimático que es ácido ascórbico. Se divulga un método que comprende además la administración de un potenciador enzimático, preferiblemente ácido ascórbico.

El precursor de sulforafano que comprende glucorafanina, y/o la enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano en sulforafano que comprende una glucosidasa, preferiblemente una tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa, puede obtenerse de cualquier fuente, incluyendo, pero no limitándose a una o más plantas de la familia Brassicaceae (también conocida como Cruciferae). Los ejemplos de plantas de la familia Brassicaceae incluyen, pero no limitándose a los siguientes: brócoli, coles de bruselas, coliflor, repollo, rábano picante, chirimía, rábano, wasabi, berros y mostaza blanca. En algunas realizaciones preferidas, la glucorafanina y la glucosidasa, preferiblemente la tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa, se obtienen a partir de brócoli, brotes de brócoli o semillas de brócoli. La glucorafanina y la glucosidasa, preferiblemente tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa, se pueden obtener de la misma fuente o de diferentes fuentes. En algunas realizaciones, tanto la glucorafanina como la glucosidasa, preferiblemente tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa, se pueden obtener a partir de un extracto o polvo de estas plantas, preferiblemente una semilla de brócoli o extracto o polvo de brotes.

La presente invención proporciona el uso de un potenciador enzimático que es ácido ascórbico para potenciar la actividad de la glucosidasa, preferiblemente tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa que es capaz de convertir glucorafanina en sulforafano. El ácido ascórbico, también conocido como ascorbato o vitamina C, puede potenciar la actividad de la mirosinasa. Se divulga que, sin ácido ascórbico, la reacción de conversión a sulforafano puede ser demasiado lenta para ocurrir en el lugar necesario para la absorción máxima. El ácido ascórbico puede obtenerse de una fuente natural, o puede producirse sintéticamente.

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

Se divulga un método que comprende la administración de ácido ascórbico, en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 250 mg, y lo más preferible de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 125 mg. En algunas realizaciones en las que el sujeto es un humano, el método comprende la administración de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg. En algunas realizaciones, el método comprende la administración de ácido ascórbico, en una cantidad de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, y la mayoría de aproximadamente 0.02 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg. En algunas realizaciones en donde el sujeto es un ser humano, el método comprende la administración de aproximadamente 0.02 mg/kg a aproximadamente 0.7 mg/kg de ácido ascórbico. Las cantidades anteriores pueden referirse a cada administración de dosificación o una dosificación diaria total.

Se divulga un método que comprende la administración de más de un potenciador enzimático. También se divulga una composición que comprende más de un potenciador enzimático. En algunas realizaciones en donde el método o composición comprende más de un potenciador enzimático, las cantidades anteriores pueden referirse a la cantidad de cada potenciador enzimático, o la cantidad total de los potenciadores enzimáticos.

La presente invención proporciona el uso de un extracto o polvo de setas. En algunas realizaciones, las setas pueden comprender "setas medicinales", incluyendo, pero no limitándose a maitake, shiitake, reishi, cremini, almendra, castaño, oreja de madera, oreja de nube, porcini, capuchón de tinta, yarta gunbu, enokitake, shimeji, leche de tigre, colmenillas, bambú, ostra dorada, ostra rosada, ostra real, hiratake, coliflor, gelatina blanca, gelatina dorada, matsutake, trufa mexicana y setas de paja. En realizaciones preferidas, la seta comprende seta maitake, seta shiitake, seta reishi y/o una mezcla de una o más de estas.

La seta maitake pertenece a la especie *Grifola frondosa*. La seta Maitake puede contener diversas fracciones que tienen actividad biológica. Los ejemplos de componentes encontrados en la seta maitake incluyen, pero no limitándose a: glucanos (como alfa-glucanos y beta-glucanos); lípidos (tales como los ácidos octadecanoico y octadecadienoico); fosfolípidos (como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y ácido fosfatídico).

La seta shiitake pertenece a la especie *Lentinula edodes*. La seta shitake puede contener varias fracciones que tienen actividad biológica. Los ejemplos de componentes que se encuentran en las setas shiitake incluyen, pero no limitándose a, glucanos (como alfa-glucanos y beta-glucanos), proteínas (como lentina); lípidos (como el ácido linoleico); y ligninas

Las setas reishi pertenecen a la especie *Ganoderma lucidum*. Las setas reishi pueden contener varias fracciones que tienen actividad biológica. Los ejemplos de componentes encontrados en la seta reishi incluyendo, pero no limitándose a: glucano (como alfa-glucanos y beta-glucanos), cantaxantina, esteroides, cumarina, ácido ganodérico y manitol.

En algunas realizaciones preferidas, el extracto o polvo de setas comprende uno o más glucanos. Un glucano es un polisacárido de un monómero D-glucosa unido por enlaces glucosídicos y puede estar en la forma alfa o beta. En algunas realizaciones, el glucano comprende uno o más alfa-glucano y/o beta-glucanos. Los alfa-glucanos incluyendo, pero no limitándose a, 1,4- $\alpha$ -glucanos y 1,6- $\alpha$ -glucanos y beta-glucanos incluyendo, pero no limitándose a 1,3- $\beta$ -glucanos, 1,4- $\beta$ -glucanos y 1,6- $\beta$ -glucanos. Los glucanos pueden expresarse en una variedad de configuraciones poliméricas. En realizaciones preferidas, el extracto o polvo de seta maitake comprende 1,3- $\beta$ -glucanos y/o 1,6- $\beta$ -glucanos. En realizaciones preferidas, el extracto o polvo de seta shiitake comprende 1,4- $\alpha$ -glucanos. En realizaciones preferidas, el extracto o polvo de seta reishi comprende 1,3- $\beta$ -glucanos y/o 1,6- $\beta$ -glucanos. En algunas realizaciones, las composiciones y métodos de la presente invención pueden comprender el uso de glucanos en una forma purificada o glucanos producidos sintéticamente, en lugar de un extracto o polvo de setas.

En algunas realizaciones, se puede usar un extracto o polvo de seta maitake. En algunas realizaciones, el extracto o polvo de seta maitake está estandarizado para contener aproximadamente 1 % a aproximadamente 75 %, más preferiblemente aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 %, incluso más preferiblemente aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 %, y lo más preferible aproximadamente 15 % a aproximadamente 20 % de uno o más glucanos, preferiblemente beta-glucanos, y más preferiblemente 1,3-beta glucano y/o 1,6-beta-glucano. Los ejemplos de extractos y polvos de setas maitake incluyendo, pero no limitándose a los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,854,404; los documentos WO 2007142130, EP 0893449; WO2009063885; WO2006107208; WO2007024496; y WO2001054673. Los polvos de setas maitake se pueden obtener, por ejemplo, mediante secado al aire, liofilización, secado en tambor, secado por aspersión, secado por calor y/o secado parcial al vacío de setas maitake. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente 250  $\mu$ g a aproximadamente 100 mg, preferiblemente aproximadamente 500  $\mu$ g a aproximadamente 75 mg, y lo más preferible aproximadamente 750  $\mu$ g a aproximadamente 50 mg. En algunas realizaciones, las composiciones adecuadas para humanos comprenden aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg de extracto de seta maitake. En algunas realizaciones, el método comprende la administración de aproximadamente 250  $\mu$ g a aproximadamente 100 mg, preferiblemente de aproximadamente 500  $\mu$ g a aproximadamente 75 mg, y lo más preferible de aproximadamente 750  $\mu$ g a aproximadamente 50 mg. En algunas realizaciones en donde el sujeto es humano, el método comprende la administración de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg de extracto de seta maitake. Las cantidades anteriores pueden referirse a cada administración de dosificación o una dosificación diaria total.

En algunas realizaciones, se puede usar un extracto o polvo de seta shiitake. En algunas realizaciones, el extracto o polvo de seta shiitake está estandarizado para contener de aproximadamente 1 % a aproximadamente 75 %, preferiblemente de aproximadamente 10 % a aproximadamente 60 %, incluso más preferible de aproximadamente 25 % a aproximadamente 50 %, y lo más preferible de aproximadamente 30 % a aproximadamente 40 % de uno o más glucanos, preferiblemente alfa-glucanos, y más preferiblemente 1,4-alfa-glucano. Los ejemplos de extractos de setas shiitake incluyendo, pero no limitándose a los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,780,097; Patente de Estados Unidos No. 6,582,723; los documentos WO2005107496, WO2007024496 y WO2000033069. Los polvos de seta maitake se pueden obtener, por ejemplo, mediante secado al aire, liofilización, secado en tambor, secado por aspersión, secado por calor y/o secado parcial al vacío de setas maitake. En algunas realizaciones, la composición comprende de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1 g, preferiblemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 500 mg, y lo más preferible de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 300 mg. En algunas realizaciones, las composiciones adecuadas para humanos comprenden aproximadamente 50 mg a aproximadamente 250 mg de extracto o polvo de seta shiitake. En algunas realizaciones, el método comprende la administración de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1 g, preferiblemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 500 mg, y lo más preferible de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 300 mg. En algunas realizaciones preferidas en las que el sujeto es humano, el método comprende la administración de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 250 mg de extracto o polvo de seta shiitake a un sujeto. Las cantidades anteriores pueden referirse a cada administración de dosificación o una dosificación diaria total. Las cantidades anteriores pueden referirse a cada administración de dosificación o una dosificación diaria total.

En algunas realizaciones, se puede usar un extracto o polvo de seta reishi. En algunas realizaciones, el extracto de seta reishi comprende aproximadamente 1 % a aproximadamente 75 %, más preferible aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 %, incluso más preferible aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 %, y lo más preferible aproximadamente 15 % a aproximadamente 20 % de uno o más glucanos, preferiblemente beta-glucanos, y más preferiblemente 1,3-beta glucano y/o 1,6-beta-glucano. Los polvos de setas maitake se pueden obtener, por ejemplo, mediante secado al aire, liofilización, secado en tambor, secado por aspersión, secado por calor y/o secado parcial al vacío de setas maitake.

En algunas realizaciones, la composición comprende el uso de un tipo de extracto o polvo de seta, tal como extracto o polvo de seta maitake, extracto o polvo de seta shiitake o extracto o polvo de seta reishi. En algunas realizaciones, la composición comprende el uso de una mezcla de uno o más tipos de extracto o polvo de seta. En algunas realizaciones, la composición comprende el uso de una mezcla de uno o más de los siguientes: extracto o polvo de seta maitake, extracto o polvo de seta shiitake y extracto o polvo de seta reishi. La composición puede comprender el uso de un extracto o un polvo, o una mezcla de extractos y polvos.

Se divulga el uso de cualquier componente rico en glucano además del extracto o polvo de seta. Un ejemplo de un componente rico en glucano es la levadura de cerveza. En algunas realizaciones, se pueden usar preparaciones de levadura. En algunas realizaciones, la preparación de levadura comprende de aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 50 %, preferiblemente de aproximadamente 0.5 % a aproximadamente 25 %, y lo más preferible de aproximadamente 0.5 % a aproximadamente 10 % de uno o más glucanos. Los ejemplos de preparaciones de levadura incluyen los discutidos en la Patente de Estados Unidos No. 5,223,491 y la Patente de Estados Unidos No. 5,576,015.

Se divulgan métodos que comprenden además la administración de uno o más componentes adicionales. Las composiciones de la presente invención pueden comprender además uno o más componentes adicionales. Los componentes adicionales pueden incluir ingredientes farmacéuticos activos, suplementos nutricionales y extractos nutricionales. Los ejemplos de componentes adicionales incluyendo, pero no limitándose a ácido ursólico, quercetina o un derivado del mismo, un amino azúcar como la glucosamina, un glicosaminoglucano como la condroitina, los insaponificables de aguacate/soja, vitaminas como la vitamina K2, la fruta del café, el magnesio, el ácido ursólico, proantocianidinas, alfa y beta-glucanos, curcumina, fitoesteroles, fitoesteranos y S-adenosilmetionina (SAME). Estos componentes adicionales pueden estar presentes en el extracto (silimarina) de cardo mariano (*Silybum marianum*), extracto de arándano (*Vaccinium macrocarpon*) (proantocianidinas, quercetina y ácido ursólico), cúrcuma (*Curcuma longa*).

En algunas realizaciones, la proporción de precursor de beta-glucano a sulforafano (beta-glucano:precursor de sulforafano) es de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 1:50, preferiblemente de aproximadamente 30:1 a aproximadamente 1:35, más preferible de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:25, más preferible de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:20, incluso más preferible de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:15, y lo más preferible de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10. En algunas realizaciones, la proporción de alfa-glucano a precursor (alfa-glucano:precursor) es de aproximadamente 1:50 a aproximadamente 100:1, preferiblemente de aproximadamente 1:25 a aproximadamente 75:1, más preferiblemente de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 50:1, más preferiblemente de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 40:1, incluso más preferible de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1, y lo más preferible de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 20:1.

En algunas realizaciones, la composición comprende una forma de dosificación unitaria, incluyendo, pero no limitándose a formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para administración oral, rectal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, transdérmica, transmucosa y tópica. En algunas realizaciones preferidas, la composición comprende una forma de dosificación administrable por vía oral o una forma de dosificación administrable por vía rectal. Los ejemplos de formas de dosificación administrables por vía oral incluyendo, pero no limitándose a un comprimido, cápsula, polvo que se puede dispersar en una bebida, un líquido como una solución, suspensión o emulsión, una cápsula masticable/gel suave, una barra masticable, u otra forma de dosificación conveniente conocida en la técnica. En realizaciones preferidas, la composición comprende un comprimido, cápsula o una golosina masticable suave. Las formas de dosificación administrables por vía oral pueden formularse para liberación inmediata, liberación prolongada o liberación retardada.

En algunas realizaciones, al menos la glucorafanina, la glucosidasa y el ácido ascórbico se proporcionan en una forma de dosificación que permite la liberación en un área del tracto gastrointestinal que tiene un pH de al menos 4 y preferiblemente al menos 5, tal como el intestino delgado, preferiblemente el duodeno. En algunas realizaciones, al menos el extracto o el polvo de brócoli se proporcionan en una forma de dosificación que permite la liberación en un área del tracto gastrointestinal que tiene un pH de al menos 4 y preferiblemente al menos 5, tal como el intestino delgado, preferiblemente el duodeno. En algunas realizaciones, el extracto o polvo de seta y/o cualquier componente adicional opcional también se libera en un área del tracto gastrointestinal que tiene un pH de al menos 4 y preferiblemente al menos 5, tal como el intestino delgado, preferiblemente el duodeno. El intestino delgado incluye el duodeno, el yeyuno y el íleon.

En algunas realizaciones, cada uno de estos componentes (es decir, glucorafanina, glucosidasa, ácido ascórbico, extracto o polvo de brócoli, extracto o polvo de setas y/o componentes adicionales) se liberan simultánea o concomitantemente (es decir, dentro de un corto periodo de tiempo entre si). Esto proporciona beneficios sobre las composiciones que contienen glucorafanina formuladas para liberar la glucorafanina en un área del tracto gastrointestinal que tiene un pH inferior a 4, como el estómago. En entornos de pH bajo como este, el entorno ácido puede desviar la conversión de glucorafanina a otros productos finales fisiológicamente inactivos, como el sulforafano nitrilo y epinitrilo.

En algunas realizaciones, las composiciones pueden comprender composiciones administrables por vía oral que comprenden formas de dosificación con recubrimiento entérico o cualquier forma de dosificación que sea resistente a la degradación en un área del tracto gastrointestinal que tiene un pH inferior a 4, tal como el estómago. Por ejemplo, la composición administrable por vía oral puede comprender un comprimido o cápsula que comprende un recubrimiento entérico. El recubrimiento entérico puede comprender materiales incluyendo, pero no limitándose a ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de acetato de polivinilo, copolímero de ácido metacrílico, copolímero de ácido metacrílico:éster acrílico, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, trimelitato de hidroxipropilmetilcelulosa, goma shellac, trimelitato de acetato de celulosa, carboximetilcelulosa y sus

mezclas. El recubrimiento entérico puede comprender cualquier polímero entérico adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, uno o más de los componentes en la composición pueden estar incrustados en una matriz de polímeros entéricos. En algunas realizaciones, las composiciones administrables por vía oral comprenden una cápsula que se disuelve lentamente en ácido gástrico y viaja al intestino delgado, como las cápsulas resistentes al ácido DRCAPS™, que se comercializan por CAPSUGEL® o cualquier otra cápsula resistente al ácido.

En la forma más preferida, la composición administrable por vía oral está rodeada por un recubrimiento que no se disuelve a menos que el medio circundante esté a un pH de al menos 4, y más preferiblemente al menos 5. Alternativamente, puede emplearse un recubrimiento que controle la liberación por tiempo, a diferencia del pH, con la rata ajustada de modo que los componentes no se liberen hasta después de que el pH del tracto gastrointestinal haya aumentado al menos a 4, y más preferiblemente al menos a 5. Por lo tanto, una formulación de liberación prolongada puede ser utilizada para prevenir la presencia gástrica de la glucorafanina, la glucosidasa y el ácido ascórbico. La capa o capas de recubrimiento pueden aplicarse sobre la composición administrable por vía oral utilizando técnicas de recubrimiento estándar. Los materiales de recubrimiento entérico se pueden disolver o dispersar en disolventes orgánicos o acuosos. El pH al que se disolverá la capa entérica puede controlarse mediante un polímero, o una combinación de polímeros, seleccionados y/o una proporción de grupos pendientes. Por ejemplo, las características de disolución de la película de polímero pueden alterarse por la proporción de grupos carboxilo libres a grupos éster. Las capas de recubrimiento 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, preservar, proteger, colorear, dar sabor y transformar los ingredientes activos en una preparación aplicable y eficaz que sea segura, conveniente y de otra manera aceptable para su uso. Los excipientes son preferiblemente excipientes farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de clases de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen lubricantes, agentes reguladores, estabilizadores, agentes sopladores, pigmentos, agentes colorantes, agentes saborizantes, agentes de relleno, agentes de carga, fragancias, modificadores de liberación, adyuvantes, plastificantes, aceleradores de flujo, agentes de liberación de molde, polioles, agentes de granulación, diluyentes, aglomerantes, reguladores, absorbentes, deslizantes, adhesivos, antiadherentes, acidulantes, suavizantes, resinas, emolientes, disolventes, tensioactivos, emulsionantes, elastómeros y mezclas de los mismos.

En la presente invención, la combinación de (i) un precursor de sulforafano que es glucorafanina, (ii) una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano en sulforafano que es una glucosidasa, preferiblemente una tioglucosidasa, y más preferiblemente mirosinasa, (iii) un potenciador enzimático que es ácido ascórbico, y (iv) un extracto o polvo de seta (que contiene glucanos) demuestra un efecto sinérgico. La sinergia se refiere al efecto en donde una combinación de dos o más componentes proporciona un resultado que 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 un efecto aditivo. En la presente invención, la combinación de glucorafanina, una glucosidasa, preferiblemente una tioglucosidasa, más preferiblemente pirosinasa, ácido ascórbico y un extracto o polvo de setas maitake, shiitake o reishi tiene un efecto estadísticamente significativo y mayor en comparación con: (i) cada componente solo, (ii) la combinación de glucorafanina y glucosidasa sola; y/o (iii) la combinación de glucorafanina, la glucosidasa y ácido ascórbico solo.

En realizaciones preferidas, la combinación de la glucorafanina, la glucosidasa, ácido ascórbico y un extracto o polvo de seta (que contiene glucanos) demuestra sinergia al tener un efecto aditivo estadísticamente significativo y/o mayor que el de la glucorafanina sola y el extracto de seta o polvo solo. En algunas realizaciones, la combinación de glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico y un extracto o polvo de seta tiene un efecto sinérgico en comparación con la combinación de glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico solo; y en comparación con los glucanos solos.

Se divulga una combinación de extracto o polvo de brócoli y un extracto o polvo de seta que tiene un efecto aditivo estadísticamente significativo y/o mayor que: (i) extracto o polvo de brócoli solo, y/o (ii) un extracto o polvo de seta solo. También se divulga una combinación de extracto o polvo de brócoli y glucano que tiene un efecto sinérgico en comparación con el extracto o polvo de brócoli solo, y glucano solo.

Se divulgan métodos de uso, que incluyen métodos de administración a un sujeto que lo necesita. Se divulga un método que comprende la administración de la combinación de glucorafanina, una glucosidasa, ácido ascórbico y un extracto o polvo de seta. También se divulga un método que comprende la administración de la combinación de un extracto o polvo de brócoli y un extracto o polvo de seta.

La composición de la presente invención es para usar como medicamento, para tratar, prevenir, reducir la incidencia de, disminuir los síntomas asociados con y/o reducir las recurrencias secundarias de cáncer de mama. En una realización preferida, se usa una composición que comprende glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico, extracto de seta maitake y extracto de seta shiitake.

Se divulga un método relacionado con el tratamiento, prevención, reducción de la incidencia de, disminución de los síntomas asociados con, y/o reducción de recurrencias secundarias de cáncer, en particular cáncer de mama, cáncer

de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de hígado y cáncer de vejiga en un sujeto. Los métodos pueden ser útiles para reducir el daño o desacelerar el daño a los tejidos y órganos, como la mama, próstata, colon, pulmón, hígado y vejiga. También se divulgan métodos para tratar, prevenir, disminuir los síntomas asociados y/o reducir las recurrencias secundarias de enfermedades y afecciones asociadas con el sistema reproductivo (incluyendo, pero no limitándose a, la mama y próstata), colon, hígado, vejiga, riñón, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, sistema pulmonar, sistema genitourinario, sistema hematopoyético y las articulaciones. También se divulgan métodos para tratar, prevenir, disminuir los síntomas asociados con, y/o reducir las recurrencias secundarias de quistes, tales como quistes benignos.

Se divulga un método relacionado con niveles crecientes o expresión génica creciente de NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO-1) en un sujeto. El método también puede ser útil para tratar, prevenir, disminuir los síntomas asociados con y/o reducir las recurrencias secundarias de enfermedades y afecciones que se beneficiarían de un aumento en la expresión génica o los niveles de NQO-1. Los ejemplos de tales enfermedades y afecciones incluyendo, pero no limitándose a cáncer, síndrome mielodisplásico, enfermedad cardiovascular y discinesia tardía.

Se divulga un método relacionado con el tratamiento, prevención, reducción de la incidencia, la disminución de los síntomas asociados y/o la reducción de las recurrencias secundarias de una enfermedad o afección asociada con niveles elevados de quinona de estrógeno. Los ejemplos de tales enfermedades o afecciones incluyen, pero no limitándose a cáncer, síndrome mielodisplásico, enfermedad cardiovascular y discinesia tardía.

Se divulgan métodos relacionados con proporcionar un efecto beneficioso sobre biomarcadores y tratar, prevenir, reducir la incidencia de, disminuir los síntomas asociados con niveles anormales de estos biomarcadores. Los ejemplos de dichos biomarcadores incluyendo, pero no limitándose a enzimas dependientes de NADPH, tioredoxina (TXN), tioredoxina reductasa-1 (Txnrd-1), subunidad 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 1 microsómica (MGST1), aldehído oxidasa (AOX1), aldo-ceto reductasa 1B8 (Akr1b8), monooxigenasa 2 que contiene flavina (FMO2), receptor III de la región del receptor de Fc (Fcgr3), triptasa beta 1 (TPSB1), proteasa-6 de mastocitos (Mcp6), neurexina-1-alfa (NRXN-1), factor de transcripción asociado a la microftalmia (MITF), yodotironina desyodinasas 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 incluyendo, pero no limitándose a cáncer, tuberculosis pulmonar y del sistema nervioso central, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, osteoartritis, asma, accidente cerebrovascular, enfisema, nefropatía diabética, intervillositis histiocítica crónica de la placenta, hipertensión, aneurisma aórtico abdominal, enfermedad inflamatoria intestinal, rinosinusitis crónica, enfermedad arterial coronaria y enfermedad renal.

Se divulga un método que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una combinación de extracto o polvo de brócoli y un extracto o polvo de seta que contiene glucano. También se divulga el método que comprende administrar al sujeto una combinación de glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico y un extracto de seta o polvo que contiene glucano. En realizaciones preferidas, las combinaciones demuestran un efecto sinérgico en los métodos divulgados.

En realizaciones preferidas, uno o más componentes de las combinaciones (por ejemplo, glucorafanina, glucosidasa, preferiblemente tioglucosidasa, más preferiblemente mirosinasa, ácido ascórbico, el extracto o polvo de seta; o el extracto de brócoli) se administran juntos en una composición o forma de dosificación, o por separado, preferiblemente dentro de un período en el que sus propiedades terapéuticas se superponen. En algunas realizaciones, los componentes de las combinaciones pueden administrarse en dos o más composiciones o formas de dosificación administrables por vía oral. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la glucorafanina, la glucosidasa y el ácido ascórbico se administran en una forma de dosificación administrable por vía oral, mientras que un extracto o polvo de seta se administran en una o más formas de dosificación administrables por vía oral separadas o adicionales. En realizaciones preferidas, los componentes de la combinación se administran en una forma de dosificación.

En algunas realizaciones, la combinación puede administrarse a una frecuencia de 1 a 10 veces al día, preferiblemente de 1 a 5 veces al día, más preferiblemente de 1 a 3 veces al día, y lo más preferible 1 vez al día.

Las dosificaciones divulgadas en esta solicitud se refieren preferiblemente a dosificaciones adecuadas para humanos. Las personas experimentadas en la técnica pueden determinar los cálculos de dosificación evaluando el peso corporal, el área de superficie, la rata metabólica y las diferencias de especies.

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

## Ejemplos

Ejemplo 1 (formulaciones)

## ES 2 755 757 T3

Los siguientes son ejemplos de la formulación de la presente invención:

### Formulación A

- 5 Extracto de semilla de brócoli que contiene glucorafanina (aproximadamente 12 % p/p), 50 mg a 5 gramos  
polvo de brote de brócoli liofilizado que contiene mirosinasa, 25 mg a 500 mg  
ácido ascórbico, 1 mg a 50 mg  
10 extracto de seta shiitake que contiene alfa glucano (aproximadamente 40 % p/p), 1 mg a 250 mg

### Formulación B

- 15 Extracto de semilla de brócoli que contiene glucorafanina (aproximadamente 12 % p/p), 50 mg a 5 gramos  
polvo de brote de brócoli liofilizado que contiene mirosinasa, 25 mg a 500 mg  
ácido ascórbico, 1 mg a 50 mg  
20 extracto de seta maitake que contiene beta glucano (aproximadamente 20 % p/p), 1 a 100 mg

### Formulación C

- 25 Una composición administrable por vía oral que comprende:

- Extracto de semilla de brócoli  
Extracto de brote de brócoli  
30 Extracto de seta maitake  
Ácido ascórbico  
35 Hidroxipropilmetilcelulosa  
Celulosa microcristalina  
Almidón de maíz  
40 Etilcelulosa  
Croscarmelosa de sodio  
45 Glicolato de almidón de sodio  
Crospovidona  
Dióxido de silicio  
50 Alginato de sodio  
Triglicéridos de cadena media  
55 Maltodextrina  
Ácido oleico  
Estearato de magnesio  
60 Ácido esteárico

### Ejemplo 2

- 65 Se desarrolló un método de cromatografía de interacción hidrófoba (HILIC), que comprende las siguientes condiciones:

## ES 2 755 757 T3

Columna: Waters BEH Amida, tamaño de partícula de 1.7 µm; 2.1 mm x 100 mm

Fase móvil: acetato de amonio 10 mM al 20 %, pH 5.0; acetonitrilo al 80%;

5 Modo de separación: isocrático

Temperatura de columna: 70 °C

Rata de flujo: 0.7 ml/min

10 Las condiciones anteriores permiten la separación de cinco glucosinolatos típicos de Brassicaceae, incluido el precursor de sulforafano, la glucorafanina.

Ejemplo 3

15 Consumo de glucorafanina en función del ácido ascórbico

Concentración

20 Aproximadamente 250 mg de extracto de semilla de brócoli que contenía aproximadamente 12 % (p/p) de glucorafanina se sometieron a hidrólisis mediante una concentración fija de mirosinasa derivada de brotes de brócoli en presencia de una concentración variable de ácido ascórbico, que varía de 0 a 600 µmoles/litro. Las mezclas de reacción se termostataron a 38 °C; se extrajeron alícuotas cada 15 minutos durante 60 minutos, y se determinó la concentración de glucorafanina por cromatografía. La rata de consumo de glucorafanina se interpretó como la rata de su conversión a sulforafano. La representación gráfica de la reducción del contenido de glucorafanina en función del aumento de la concentración de ácido ascórbico da como resultado una serie de gráficos lineales; las pendientes de las líneas de regresión lineal reflejan la rata de consumo de glucorafanina, en µmoles/minuto. Es evidente que en presencia de una concentración de 600 µmoles/litro de ácido ascórbico, la rata de reacción aumentó 13 veces con respecto a la que se produjo en ausencia de efectos moduladores del ácido ascórbico.

30

Tiempo, min	Contenido de ácido ascórbico							
	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	µmoles GR
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
Intersección	93.496	93.271	93.123	93.053	93.386	93.270	92.734	µmol

Ejemplo 4

35 Conversión equimolar de glucorafanina a sulforafano

Se realizó un experimento de dos partes para dilucidar aún más el papel del ácido ascórbico en la modulación de la actividad de la mirosinasa. Todas las soluciones se prepararon en solución salina regulada con Tris 20 mM, a pH 7.5, previamente identificada como óptima para la actividad de mirosinasa; cada tubo de muestra tenía 100 mg de polvo de brócoli liofilizado pesado con precisión como fuente de mirosinasa. El experimento se realizó a 38 °C durante 2 horas, con alícuotas de muestra retiradas en incrementos de 30 minutos, y el contenido de glucorafanina y sulforafano se evaluó por HPLC. Se utilizó una solución de "parada" fuertemente ácida para inhibir instantáneamente la actividad de mirosinasa adicional en las alícuotas retiradas. Una muestra de control no contenía ácido ascórbico, y la conversión enzimática se realizó sin ayuda de un cofactor.

45 Parte 1. En presencia de la concentración fija de ácido ascórbico, 1 mmol/litro, se añadió una cantidad creciente de extracto de semilla de brócoli (aproximadamente 12 % de glucorafanina, p/p), que oscila entre 250 mg y 500 mg.

Parte 2. Mientras se mantiene la cantidad de extracto de semilla de brócoli fija en 250 mg, la concentración de ácido ascórbico se varió de 0.4 mmol/litro a 3.8 mmol/litro.

5 La siguiente tabla presenta glucorafanina y sulforafano expresados en  $\mu$ moles. Es evidente que dentro de los primeros 30 minutos en casi todas las mezclas de reacción, se completó la conversión de glucorafanina a sulforafano. Sin embargo, un examen cuidadoso de la conversión enzimática que ocurre en la muestra de 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, $\mu$ moles					Sulforafano, $\mu$ 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

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

15 Finalmente, el examen del rendimiento de sulforafano después de 30 minutos dentro de la Parte 1 del experimento, revela que en presencia de 1 mmol/litro de ácido ascórbico, la cantidad fija de mirosinasa contenida en 100 mg de polvo de brote de brócoli liofilizado es capaz de generar al menos 200  $\mu$ moles de sulforafano, de una manera previsiblemente lineal. Las figuras 1, 2, 3 y 4 demuestran los resultados de este estudio.

20 Ejemplo 5

Conversión de glucorafanina a sulforafano en presencia de fluido intestinal simulado

25 Se usó polvo de fluido intestinal simulado (SIF), un concentrado suministrado comercialmente 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 (paletas), donde en seis recipientes de disolución se dispensaron 500 ml de fluido intestinal simulado, junto con 150 mg de polvo de brote de brócoli liofilizado como una fuente de mirosinasa. En los recipientes 1-4, la concentración de ácido ascórbico varió de 0.25 a 1.00 mmol/litro; en el recipiente 5, además de 1 mmol/litro de ácido ascórbico, se suspendieron 3.125 g de pancreatina (8x USP); en el recipiente 6, además de 1 mmol/litro de ácido ascórbico y 3.125 g de pancreatina (8x USP), se agregó una cantidad duplicada de polvo de brote de brócoli liofilizado (300 mg). Después de llevar los recipientes a 38 °C, se añadieron a cada uno 250 mg de extracto de semilla de brócoli rico en glucorafanina (12 % p/p), y las suspensiones resultantes se agitaron a 75 RPM durante 2 horas. Se extrajeron alícuotas cada 15 minutos y se ensayó el sulforafano. La figura 4 muestra una correlación directa entre un mayor rendimiento de sulforafano y concentraciones más altas de ácido ascórbico, especialmente en las primeras etapas del experimento.

35 Ejemplo 6

40 El siguiente estudio se realizó para determinar el efecto de la combinación de sulforafano y un extracto de seta maitake que contiene b-glucanos al 20 % en la expresión génica de Nad(P)H:quinona oxidorreductasa 1(NQO-1). NQO-1 codifica una proteína que es capaz de metabolizar las quinonas de estrógenos, evitando que formen aductos de ADN que causan mutaciones y finalmente carcinogénesis. Un aumento en la expresión de NQO-1 es favorable para la salud de mamas, colon, hígado, pulmón, piel y próstata.

45 En el estudio, la línea celular de macrófagos RAW 264.7 se trató con DMSO (vehículo control), sulforafano (SFN), extracto de seta maitake que tiene aproximadamente un 20 % de contenido de beta-glucano (Maitake), o la

combinación de sulforafano y extracto de seta maitake, por 24 horas. En particular, las células se trataron con uno de los siguientes: (i) DMSO (vehículo control), (ii) SFN 0.5  $\mu$ M, (iii) Maitake 250  $\mu$ g/ml, (iv) Maitake 500  $\mu$ g/ml, (v) Maitake 750  $\mu$ g/ml, (vi) SFN 0.5  $\mu$ M y Maitake 250  $\mu$ g/ml, (vii) SFN 0.5  $\mu$ M y Maitake 500  $\mu$ g/ml, y (viii) SFN 0.5  $\mu$ M y Maitake 750  $\mu$ g/ml. La expresión génica de la expresión génica de NQO-1 se analizó mediante RT-PCR cuantitativa. Los resultados, que se representan en la figura 5, muestran lo siguiente:

5

Tratamiento	Veces de aumento en la expresión génica de NQO-1
DMSO	1.00
0.5 $\mu$ M SFN	12.96
250 $\mu$ g/ml Maitake	1.34
0.5 $\mu$ M SFN + 250 $\mu$ g/ml Maitake	55.97
500 $\mu$ g/ml Maitake	1.67
0.5 $\mu$ M SFN + 500 $\mu$ g/ml Maitake	60.52
750 $\mu$ g/ml Maitake	2.31
0.5 $\mu$ M SFN + 750 $\mu$ g/ml Maitake	59.47

Los resultados demuestran que la combinación de sulforafano y extracto de seta maitake tuvo un efecto sinérgico en comparación con cada componente solo. Se encontró que este efecto era más que simplemente aditivo.

10

#### Ejemplo 7

El siguiente estudio se realizó para determinar el efecto de la combinación de sulforafano y un extracto de seta shiitake que contiene 40 % de alfa glucanos en la expresión génica de Nad(P)H:quinonequinona oxidoreductasa 1 (NQO-1).

15

En el estudio, la línea celular de macrófagos RAW 264.7 se trató con DMSO (vehículo control), sulforafano (SFN), extracto de seta shiitake que tiene al menos un 20 % de contenido de alfa-glucano (Shiitake), o la combinación de sulforafano y extracto de seta shiitake, por 24 horas. En particular, las células se trataron con uno de los siguientes: (i) DMSO (vehículo control), (ii) SFN 0.5  $\mu$ M, (iii) Shiitake 100  $\mu$ g/ml, (iv) Shiitake 250  $\mu$ g/ml, (v) Shiitake 500  $\mu$ g/ml, (vi) SFN 0.5  $\mu$ M y Shiitake 100  $\mu$ g/ml, (vii) SFN 0.5  $\mu$ M y Shiitake 250  $\mu$ g/ml, y (viii) SFN 0.5  $\mu$ M y Shiitake 500  $\mu$ g/ml. La expresión génica de la expresión génica de NQO-1 se analizó mediante RT-PCR cuantitativa. Los resultados, que se representan en la figura 6, muestran lo siguiente:

20

Tratamiento	Veces de aumento en la expresión génica de NQO-1
DMSO	1.00
0.5 $\mu$ M SFN	12.96
100 $\mu$ g/ml Shiitake	1.00
0.5 $\mu$ M SFN + 100 $\mu$ g/ml Shiitake	14.58
250 $\mu$ g/ml Shiitake	1.27
0.5 $\mu$ M SFN + 250 $\mu$ g/ml Shiitake	16.07
500 $\mu$ g/ml Shiitake	1.26
0.5 $\mu$ M SFN + 500 $\mu$ g/ml Shiitake	15.20

Los resultados demuestran que la combinación de sulforafano y extracto de seta shiitake tuvo un efecto sinérgico en comparación con cada componente solo. Se encontró que este efecto era más que simplemente aditivo.

Ejemplo 8

5 Un sujeto presenta cáncer de mama y sufre síntomas que incluyen tejido mamario dañado y dolor en la mama. Se le administra un comprimido que contiene glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico y un extracto de seta maitake. El comprimido es una formulación con recubrimiento entérico que libera el contenido en el intestino delgado. Después de un mes de administración diaria de la tableta, el sujeto experimenta la modulación de biomarcadores sustitutos que incluyen NQO-1 que se correlacionan con una mejoría de los síntomas.

Ejemplo 9

15 Un sujeto presenta cáncer de mama y sufre síntomas que incluyen tejido mamario dañado y dolor en la mama. Se le administra un comprimido que contiene glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico y un extracto de seta shiitake. El comprimido es una formulación con recubrimiento entérico que libera el contenido en el intestino delgado. Después de un mes de administración diaria del comprimido, el sujeto experimenta la modulación de biomarcadores sustitutos que incluyen NQO-1 que se correlacionan con la mejoría de los síntomas.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición administrable por vía oral que comprende:
- 5 - un precursor de sulforafano que es glucorafanina;
- una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano en sulforafano, que es una glucosidasa;
- 10 - un potenciador enzimático que es ácido ascórbico; y
- un extracto o polvo de seta.
2. La composición administrable por vía oral de la reivindicación 1, en donde la glucosidasa es mirosinasa.
- 15 3. La composición administrable por vía oral de la reivindicación 1, en donde la composición comprende una forma de dosificación con recubrimiento entérico.
4. La composición administrable por vía oral de la reivindicación 1, en donde el extracto o polvo de seta comprende extracto de seta maitake.
- 20 5. La composición administrable por vía oral de la reivindicación 1, en donde el extracto o polvo de seta comprende extracto de seta shiitake.
6. La composición administrable por vía oral de la reivindicación 1, en donde el extracto o polvo de seta comprende una mezcla de extracto de seta maitake y extracto de seta shiitake.
- 25 7. La composición administrable por vía oral de la reivindicación 1, en donde la composición comprende además uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en: quercetina, un amino azúcar, un glicosaminoglicano, insaponificables de aguacate/soja, una vitamina, fruta de café, magnesio, silimarina, proantocianidinas, ácido ursólico, curcumina, fitoesteroles y fitoestanoles.
- 30 8. La composición administrable por vía oral de la reivindicación 1, que comprende glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico, extracto de seta maitake y extracto de seta shiitake.
- 35 9. La composición administrable por vía oral de la reivindicación 1, en donde la composición comprende extracto o polvo de brócoli.
10. Una composición administrable por vía oral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el precursor de sulforafano está comprendido en un extracto o polvo de brócoli.
- 40 11. La composición administrable por vía oral de la reivindicación 10, en donde el extracto o polvo de brócoli comprende glucorafanina en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 75 % p/p.
- 45 12. La composición administrable por vía oral de la reivindicación 10, en donde el extracto o polvo de brócoli comprende mirosinasa.
13. La composición administrable por vía oral de la reivindicación 10, en donde el extracto o polvo de seta comprende uno o más extractos o polvos de seta seleccionados del grupo de: extracto de seta maitake, extracto de seta shiitake y extracto de seta reishi.
- 50 14. La composición administrable por vía oral de la reivindicación 10, que comprende un extracto de seta maitake y un extracto de seta shiitake.
15. Una composición que comprende:
- 55 - un precursor de sulforafano que es glucorafanina;
- una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano en sulforafano que es glucosidasa;
- 60 - un potenciador enzimático que es ácido ascórbico; y
- un extracto o polvo de seta;
- 65 para uso como medicamento para tratar, prevenir, reducir la incidencia de, disminuir los síntomas asociados con y reducir las recurrencias secundarias de cáncer de mama.

16. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la composición comprende glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico, extracto de seta maitake y extracto de seta shiitake.

FIG. 1

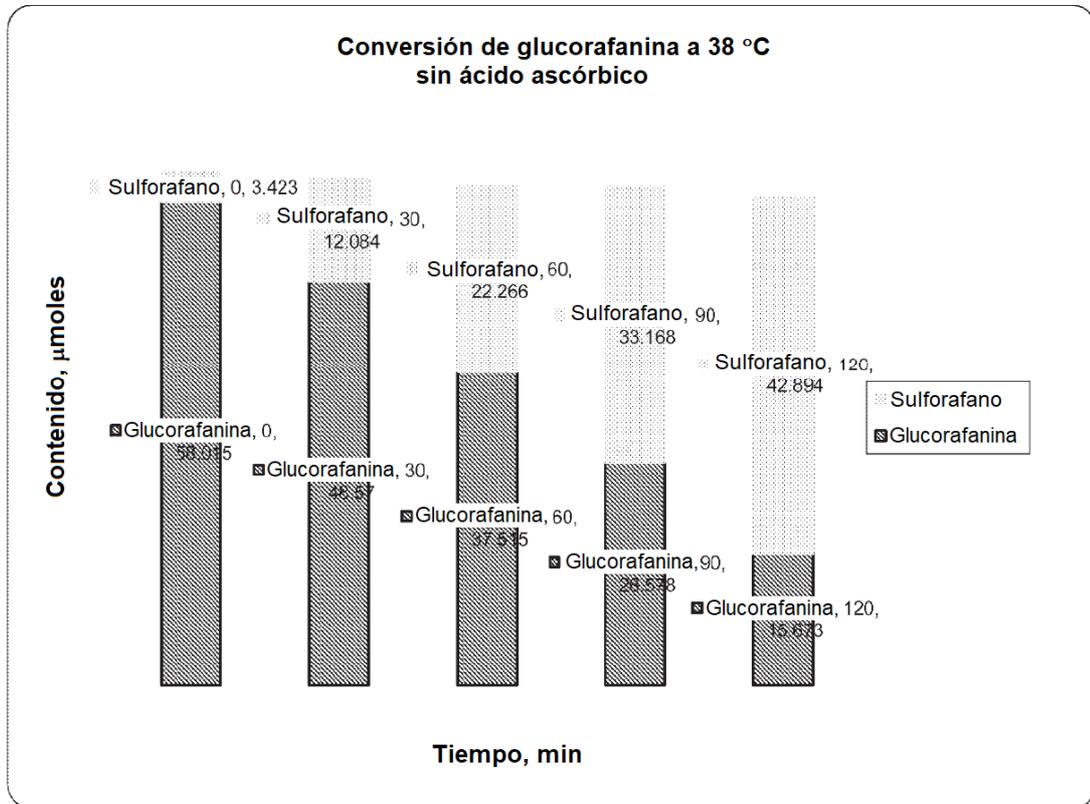


FIG. 2

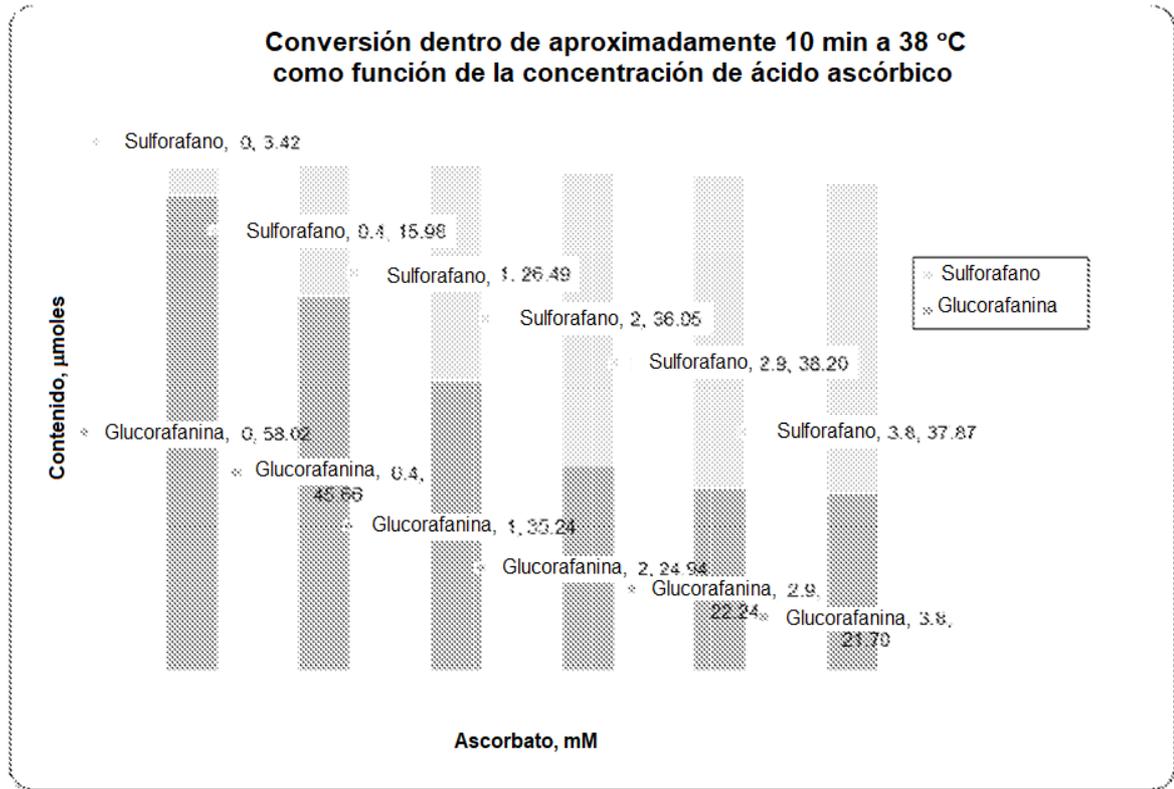


FIG. 3

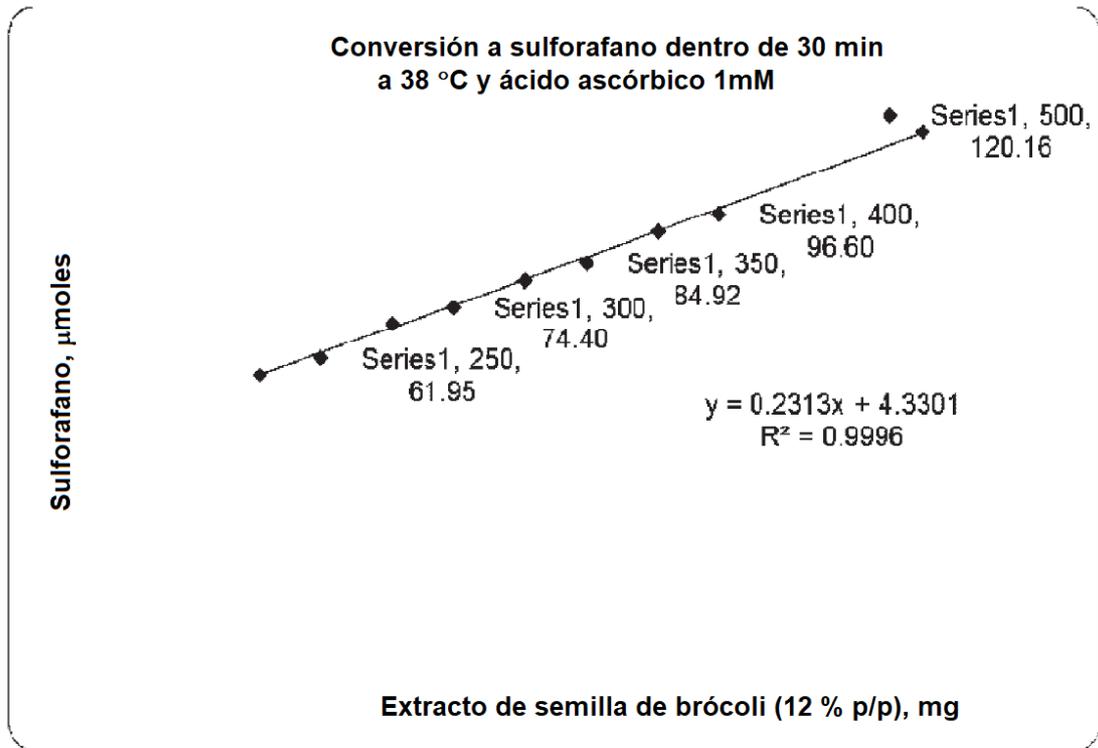


FIG. 4

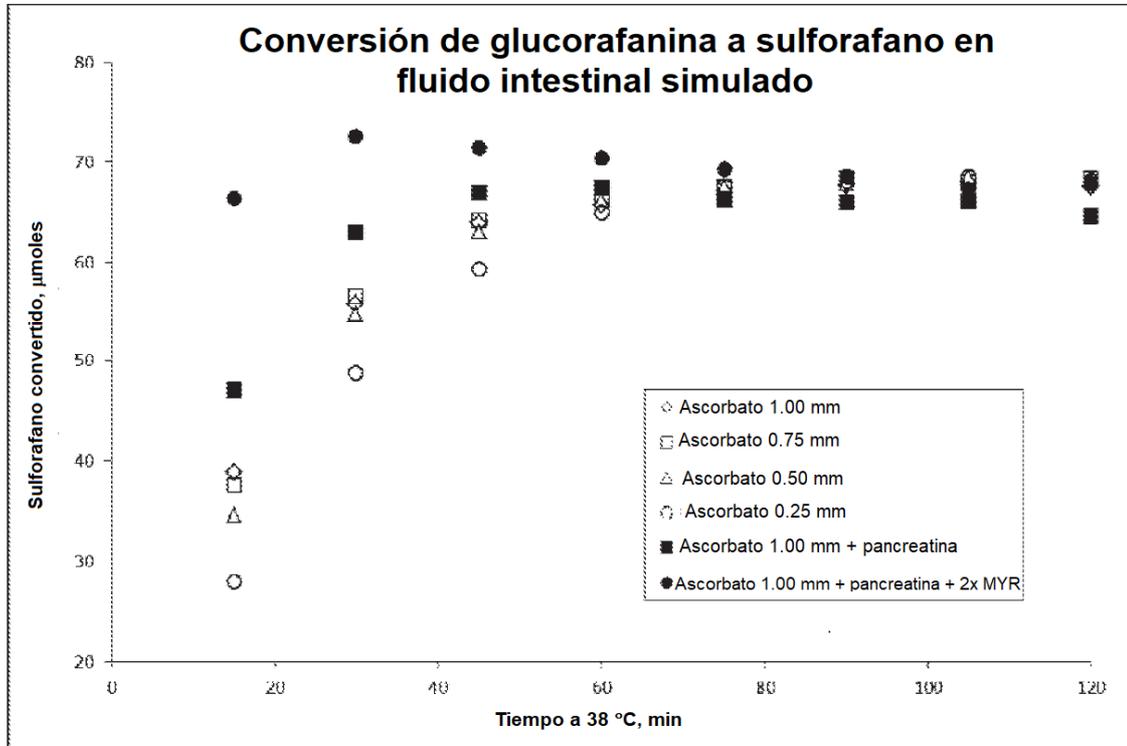


FIG. 5

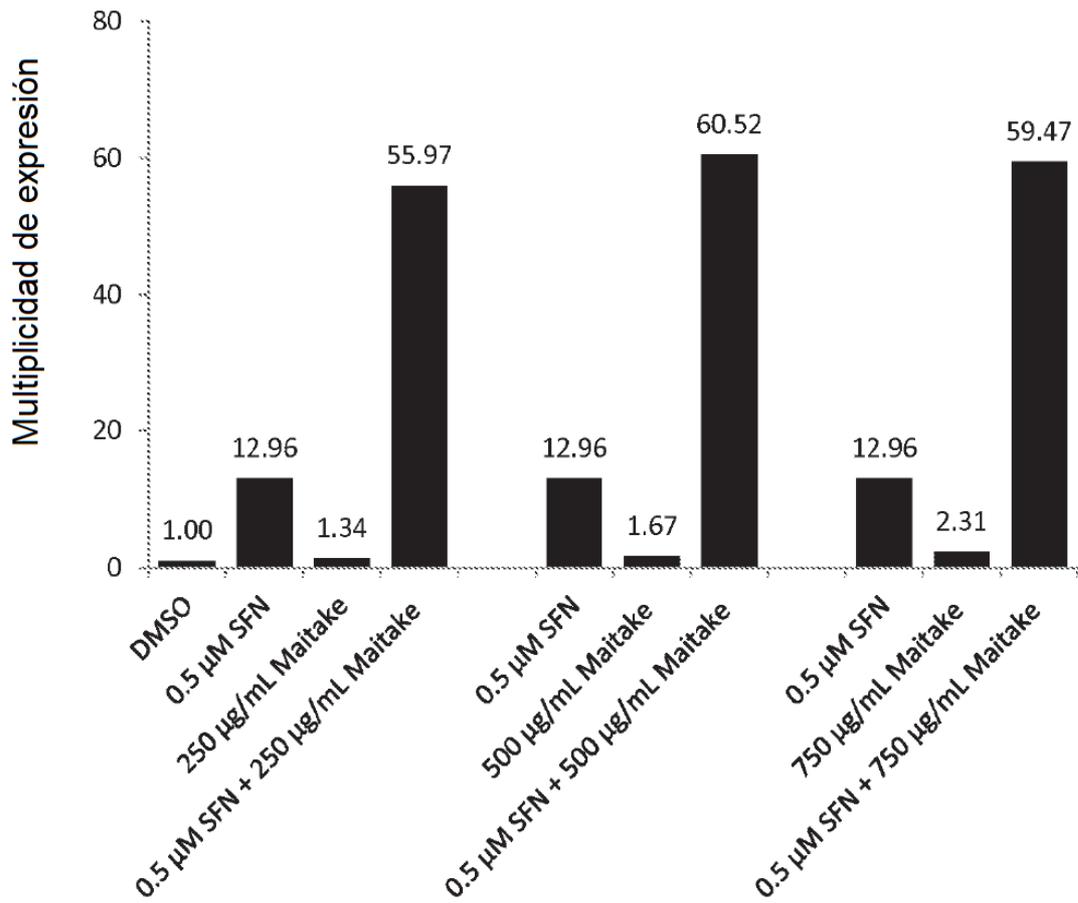


FIG. 6

