

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 084**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/197** (2006.01) **A61K 31/555** (2006.01)  
**A61K 31/4415** (2006.01) **A61K 31/593** (2006.01)  
**A61K 36/28** (2006.01) **A61K 31/714** (2006.01)  
**A61K 36/45** (2006.01) **A61K 33/30** (2006.01)  
**A61K 36/67** (2006.01) **A23L 33/105** (2006.01)  
**A61K 31/4188** (2006.01)  
**A61K 31/4525** (2006.01)  
**A61K 31/455** (2006.01)  
**A61K 31/51** (2006.01)  
**A61K 31/525** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2015** **E 17203260 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020** **EP 3332793**

54 Título: **Composición que comprende una mezcla de extractos vegetales o una mezcla de moléculas contenidas en estos vegetales y utilización para actuar sobre el metabolismo glucídico y/o lipídico**

30 Prioridad:

**20.10.2014 FR 1460064**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.12.2020**

73 Titular/es:

**VALBIOTIS (25.0%)**  
**Rue Paul Vatine, ZI des quatre Chevaliers,**  
**Bâtiment F**  
**17180 Perigny, FR;**  
**UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE (25.0%);**  
**UNIVERSITE DE LA ROCHELLE (25.0%) y**  
**CNRS (25.0%)**

72 Inventor/es:

**PELTIER, SÉBASTIEN;**  
**SIRVENT, PASCAL y**  
**MAUGARD, THIERRY**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 797 084 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

Composición que comprende una mezcla de extractos vegetales o una mezcla de moléculas contenidas en estos vegetales y utilización para actuar sobre el metabolismo glucídico y/o lipídico

La presente invención se refiere a la prevención y al tratamiento de los desajustes del metabolismo glucídico y/o lipídico en el ser humano o el animal.

La diabetes tipo 2, la forma más frecuente de diabetes, es una enfermedad metabólica crónica y progresiva. Se caracteriza por una hiperglucemia crónica, es decir una concentración de azúcar en la sangre anómalamente elevada, y una intolerancia a los glúcidos. La principal causa de este estado hiperglucémico crónico es una resistencia a la insulina así como su secreción inadecuada en respuesta a un estado metabólico dado, pero pueden intervenir otros factores (Ismail-Beigi F N Engl J Med 2012; 366:1319-27). Para luchar contra la diabetes tipo 2, principalmente conviene reducir los niveles de glucemia, disminuir la hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) a una tasa inferior o igual al 6.5%, y mejorar la sensibilidad a la insulina.

El tratamiento de la diabetes tipo 2 consiste en primer lugar en una modificación del modo de vida o medidas higienico-dietéticas (MHD: alimentación, tabaco, actividades físicas y deportivas). Si las MHD no son suficientes, entonces conviene recurrir a agentes terapéuticos antidiabéticos, generalmente metformina. Ahora bien, la metformina presenta numerosas contraindicaciones médicas, tales como insuficiencia renal crónica, acidosis, hipoxia, deshidratación, etc. Por tanto, existe una paradoja importante para la metformina ya que su prescripción no es posible en pacientes con diabetes tipo 2 que presentan una insuficiencia renal, ahora bien, la insuficiencia renal es una de las consecuencias frecuentes de la diabetes tipo 2. Se han desarrollado otros agentes terapéuticos tales como inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), análogos del péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), tiazolidindionas (TZDs), sulfonilureas, inhibidores de las glucosidasas (acarbose, miglitol, voglibosa) o incluso inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa 2 (SGLT2). No obstante, la correcta combinación terapéutica es compleja ya que necesita tener en cuenta un número importante de factores tales como las contraindicaciones y los efectos no deseados, que afectan a la calidad de vida de los pacientes y por tanto a su adherencia al tratamiento médico. Además, determinadas combinaciones terapéuticas aumentan la mortalidad por cualquier causa tales como la asociación de la metformina con las sulfonilureas (Prescrire Int 2015; 24:130-5).

Dado que los pacientes sólo siguen las MHD de manera muy poco frecuente, se necesita muy rápidamente instaurar un tratamiento terapéutico con todos los efectos no deseados y contraindicaciones asociados a estas moléculas, y en la actualidad no existe ninguna solución adaptada al cuidado de los pacientes con diabetes tipo 2 entre las MHD y la instauración de un tratamiento terapéutico.

Por otro lado, los pacientes con diabetes tipo 2 tienen un riesgo elevado de morbimortalidad cardiovascular. Por tanto, también es necesario tener en cuenta los factores de riesgo cardiovascular tradicionales tales como, en particular, el control de los lípidos en circulación, del peso y de la presión arterial. Esta necesidad induce en la actualidad la toma simultánea de varios medicamentos de diferentes clases terapéuticas. Ahora bien, la combinación de fármacos puede generar algunas veces reacciones secundarias graves tales como, por ejemplo, la administración simultánea de fibratos y de estatinas que aumenta el riesgo de miopatía (Denke MA J Manag Care Pharm 2003; 9:17-9).

Por tanto, existe una necesidad real de productos que puedan utilizarse a la vez durante la instauración leve de las patologías cardiometabólicas, caracterizada por una elevación de determinados factores de riesgo (trastornos glucídicos, trastornos lipídicos, sobrepeso, inflamación, estrés oxidante, hipertensión arterial), y durante la aparición de estas patologías, en particular diabetes tipo 2.

Por otro lado, existe una necesidad urgente de soluciones de prevención y de medicamentos cuyo mecanismo de acción "de múltiples dianas" presente ventajas en cuanto al cumplimiento, la tolerancia y la eficacia. Tales productos permitirían disminuir el riesgo global de enfermedades cardiometabólicas y prevenir y tratar cada disfunción y/o sus consecuencias tomadas de manera independiente.

El objetivo de la invención es responder a estas diferentes necesidades proponiendo composiciones que puedan actuar de manera simultánea sobre varias disfunciones glucídicas y lipídicas, que representen a la vez un medio de prevención y un medio terapéutico ventajoso para prevenir y tratar las enfermedades cardiometabólicas y sus complicaciones.

Para responder a su objetivo, la invención se refiere a composiciones que comprenden por lo menos una mezcla de moléculas obtenidas por lo menos a partir de:

- *Chrysanthellum indicum*, y
- *Cynara scolymus*, y
- *Vaccinium myrtillus*, y
- *Olea europaea*

comprendiendo asimismo dicha mezcla de moléculas piperina.

Se trata de una mezcla sinérgica, actuando las moléculas presentes en la mezcla en sinergia.

Ya se han descrito extractos de *Chrysanthellum indicum*, extractos de *Cynara scolymus*, extractos de *Vaccinium myrtillus* y la piperina y algunos se han utilizado en productos de nutrición, pero, de manera inesperada, la combinación de por lo menos un extracto de *Chrysanthellum indicum*, con por lo menos un extracto de *Cynara scolymu*, un extracto de *Vaccinium myrtillus* y piperina conduce a resultados sorprendentes a la vez sobre el metabolismo glucídico y sobre el metabolismo lipídico en el ser humano o el animal.

Para responder a su objetivo, la invención también se refiere a composiciones constituidas por por lo menos piperina y moléculas específicas particulares contenidas en *Chrysanthellum indicum*, *Cynara scolymus* y *Vaccinium myrtillus* y *olea europaea* (siendo estas moléculas naturales y/o sintéticas), en particular una composición que comprende una mezcla de por lo menos cinco moléculas, siendo por lo menos una molécula piperina, eligiéndose por lo menos una molécula de entre la oleuropeína y el hidroxitirosol, eligiéndose por lo menos una molécula del 7-O-glucurónido de apigenina, la crisantelina A, la crisantelina B, el ácido cafeico, la luteolina, la maritimina, el eriodictiol, la isookanina, la apigenina, luteolina-7-O-glucósido, la maritimina, la mareína, eriodictiol-7-O-glucósido, la flavomareína, el 8-C- $\alpha$ -L-arabinósido-6-C- $\beta$ -D-glucósido de apigenina (shaftósido), apigenina-6,8-C-di- $\beta$ -D-glucopiranósido (vicenina 2), y eligiéndose por lo menos una molécula de un ácido dicafeoilquinico, un ácido sulfo-monocafeoilquinico, la luteolina, luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucurónido, apigenina-7-O-glucósido, la cinaropicrina, y eligiéndose por lo menos una molécula de un ácido monocafeoilquinico, delfinidina-3-galactósido, delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, delfinidina-3-arabinósido, cianidina-3-glucósido, petunidina-3-galactósido, cianidina-3-arabinósido, petunidina-glucósido, peonidina-3-galactósido, petunidina-3-arabinósido, peonidina-3-glucósido, malvidina-3-galactósido, malvidina-3-glucósido, malvidina-3-arabinósido, o sus análogos.

En la presente solicitud, se utilizarán indistintamente el singular o el plural para designar las composiciones según la invención.

Ventajosamente, las composiciones según la invención impiden la instauración de una hiperglucemia crónica y disminuyen la glucemia, disminuyen la hemoglobina glicosilada, permiten mejorar la tolerancia a los glúcidos ingeridos, mejoran la sensibilidad a la insulina, pero también pueden actuar sobre otros factores de riesgo cardiovascular tales como la dislipidemia, el sobrepeso y la obesidad, y la tensión arterial. Además, no presentan ningún, o presentan pocos, efectos secundarios con respecto a los observados con los tratamientos existentes y los que están desarrollándose.

Por tanto, la invención también se refiere a la utilización de las composiciones como productos nutricionales o productos de salud, en particular como medicamentos, en particular para prevenir y/o luchar contra los desajustes del metabolismo glucídico y lipídico en el ser humano o el animal.

A continuación se describe la invención con mayor detalle haciendo referencia a las figuras adjuntas que representan:

- Figura 1: los resultados para cuatro composiciones de una prueba oral de sensibilidad a la insulina correspondientes a los resultados de la tabla 9 (punto II.1).
- Figura 2: los resultados que demuestran el efecto de sinergia aportado por una composición según la invención, correspondiendo estos resultados a los resultados de la tabla 13 (punto II.1) para la glucemia en ayunas.
- Figura 3: los resultados que demuestran el efecto de sinergia aportado por una composición según la invención, correspondiendo estos resultados a los resultados de la tabla 13 (punto II.1) para la tolerancia a los glúcidos.
- Figura 4: los resultados que demuestran el efecto de sinergia aportado por una composición según la invención, correspondiendo estos resultados a los resultados de la tabla 14 (punto II.1) para la glucemia en ayunas.
- Figura 5: los resultados que demuestran el efecto de sinergia aportado por una composición según la invención, correspondiendo estos resultados a los resultados de la tabla 14 (punto II.1) para la tolerancia a los glúcidos.
- Figura 6: los resultados que demuestran el efecto de sinergia aportado por una composición según la invención, correspondiendo estos resultados a los resultados de la tabla 14 (punto II.1) para la sensibilidad a la insulina.

- Figura 7: los resultados para el efecto de una composición según la invención y la metformina, sobre la sensibilidad a la insulina, correspondiendo estos resultados a los resultados de la tabla 15 (punto II.2).
- 5 - Figura 8: los resultados para el efecto de una composición según la invención sobre la evolución de la masa corporal, correspondiendo estos resultados a los resultados de la tabla 15 (punto II.2).
- Figura 9: los resultados para el efecto de una composición según la invención sobre la evolución de la glucemia en ayunas, correspondiendo estos resultados a los resultados de la tabla 15 (punto II.2).
- 10 - Figura 10: los resultados de un inmunotransferencia de tipo Western que muestra un aumento de la cantidad de AMPK a nivel del hígado de ratón con una composición según la invención (punto II.2).
- Figura 11: los resultados de pruebas que muestran la ausencia de efecto hipoglucemiante tras una sola dosis con una composición según la invención (punto II.3).
- 15 - Figura 12: los resultados de pruebas que muestran el efecto de una composición según la invención sobre la evolución del aumento de masa corporal (punto II.4).

20 La invención tiene por objeto una composición que comprende por lo menos una mezcla de moléculas obtenida por lo menos a partir de:

- *Chrysanthellum indicum*, y
- *Cynara scolymus*, y
- 25 - *Vaccinium myrtillus*, y
- *Olea europea*

comprendiendo asimismo dicha mezcla de moléculas piperina.

30 Por tanto, la invención se refiere a una composición que comprende por lo menos piperina, por lo menos una molécula procedente de *Chrysanthellum indicum*, por lo menos una molécula procedente de *Cynara scolymus*, por lo menos una molécula procedente de *Vaccinium myrtillus*, y por lo menos una molécula procedente de la *Olea europea*.

35 Además de *Chrysanthellum indicum*, *Cynara scolymus*, *Vaccinium myrtillus*, *Olea europaea* y piperina, la composición según la invención también puede contener otros compuestos.

Según un primer modo de realización, la composición según la invención comprende por lo menos:

- 40 - un extracto de *Chrysanthellum indicum*, y
- un extracto de *Cynara scolymus*, y
- un extracto de *Vaccinium myrtillus*, y
- un extracto de *Olea europaea*, y
- 45 - piperina sintética y/o un extracto de *Piper* que contiene piperina.

Por extracto de planta "X" o de materia prima vegetal "X" en el contexto de la invención se entiende por lo menos una molécula, preferentemente un conjunto de moléculas obtenido a partir de la planta "X" mediante cualquier procedimiento adaptado. En particular pueden mencionarse los extractos acuosos (obtenidos con la ayuda de un disolvente acuoso), alcohólicos (obtenidos con la ayuda de un disolvente alcohólico) o utilizando un disolvente orgánico, o con la ayuda de un cuerpo graso natural o una mezcla de cuerpos grasos naturales, en particular un aceite vegetal o una mezcla de aceites vegetales. Por disolvente acuoso se entiende cualquier disolvente constituido en su totalidad o en parte por agua. De este modo puede citarse el agua propiamente dicha, los disolventes hidroalcohólicos en cualquier proporción o incluso los disolventes constituidos por agua y por un compuesto tal como la glicerina o el propilenglicol en cualquier proporción. Entre los disolventes alcohólicos puede mencionarse en particular el etanol.

Por planta o materia prima vegetal en el contexto de la invención se hace referencia la planta entera o parte de planta, incluyendo los cultivos celulares, que aún no se ha sometido a tratamiento específico y destinada a entrar en la fabricación de una preparación de planta.

60 Los extractos de plantas pueden obtenerse mediante cualquier procedimiento adaptado, por ejemplo mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- extracción sólido/líquido
- 65 - separación/prensado
- filtración

- evaporación
- secado
- eventualmente incorporación de aditivos
- homogeneización
- acondicionamiento.

El extracto de *Chrysanthellum indicum* es preferentemente un extracto de planta entera o de las partes aéreas.

Puede tratarse en particular de un extracto hidroalcohólico o acuoso o CO<sub>2</sub> subcrítico o H<sub>2</sub>O subcrítica o asociado a un tratamiento térmico realizado mediante calentamiento clásico o con frecuencia de microondas o con ultrasonidos.

La razón de planta/extracto está preferentemente comprendida entre 1/1 y 100/1, en particular entre 1/1 y 25/1.

La composición según la invención, cuando está destinada para el ser humano, comprende preferentemente una cantidad de extracto de *Chrysanthellum indicum* que permite la administración de por lo menos 0,00001 g, en particular entre 0,00001 g y 0,60 g, de extracto de *Chrysanthellum indicum* por kg de peso corporal de la persona a la que se administra la composición y al día.

De manera preferida, el extracto de *Chrysanthellum indicum* comprende por lo menos una molécula seleccionada de entre apigenina-7-O-glucurónido, la crisantelina A, la crisantelina B, el ácido cafeico, la luteolina, la maritimetina, el eriodictiol, la isookanina, la apigenina, luteolina-7-O-glucósido, la maritimeína, la mareína, eriodictiol-7-O-glucósido, la flavomareína, el 8-C- $\alpha$ -L-arabinósido-6-C- $\beta$ -D-glucósido de apigenina (shaftósido), apigenina-6,8-C-di- $\beta$ -D-glucopiranósido (vicenina 2), o sus análogos. Preferentemente el extracto comprende por lo menos 7-O-glucurónido de apigenina.

Por análogos en el contexto de la presente invención se entiende cualquier compuesto que presenta una estructura química similar a otro compuesto, pero diferente del mismo por un determinado componente. Puede diferenciarse en uno o varios átomos, grupos funcionales, estructuras secundarias, que se sustituyen por otros átomos, grupos funcionales o estructuras secundarias. Pueden mencionarse, por ejemplo, los análogos del 7-O-glucurónido de apigenina tales como el 7-apioglucósido de apigenina, el 8-C-glucósido de apigenina (vitexina), el 6-C-glucósido de apigenina (isovitexina), el 7-O-neohesperidósido de apigenina, el 7-glucósido de apigenina, el 7-apioglucósido de apigenina.

El extracto de *Cynara scolymus* es preferentemente un extracto de hojas o de raíces.

Puede tratarse en particular de un extracto hidroalcohólico o acuoso o CO<sub>2</sub> subcrítico o H<sub>2</sub>O subcrítico o asociado a un tratamiento térmico realizado mediante calentamiento clásico o con frecuencia de microondas o con ultrasonidos.

La razón de planta/extracto está preferentemente comprendida entre 1/1 y 100/1, en particular entre 1/1 y 30/1.

La composición según la invención, cuando está destinada al ser humano, comprende preferentemente una cantidad de extracto de *Cynara scolymus* que permite la administración de por lo menos 0,00001 g, en particular entre 0,00001 g y 0,60 g, de extracto de *Cynara scolymus* por kg de peso corporal de la persona a la que se administra la composición y al día.

De manera preferida, el extracto de *Cynara scolymus* comprende por lo menos una molécula seleccionada de entre un ácido dicafeoilquínico, un ácido sulfo-monocafeoilquínico, la luteolina, luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucurónido, apigenina-7-O-glucósido, la cinaropicrina, o sus análogos. Preferentemente, el extracto comprende por lo menos un ácido dicafeoilquínico.

El extracto de *Vaccinium myrtillus* es preferentemente un extracto de frutos o de hojas.

Puede tratarse en particular de un extracto hidroalcohólico o acuoso o CO<sub>2</sub> subcrítico o H<sub>2</sub>O subcrítico o asociado a un tratamiento térmico realizado mediante calentamiento clásico o con frecuencia de microondas o con ultrasonidos.

La razón de planta/extracto está preferentemente comprendida entre 1/1 y 200/1, en particular entre 1/1 y 60/1.

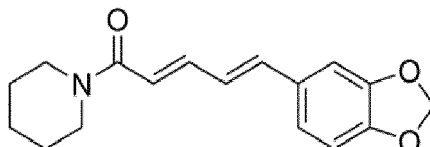
La composición según la invención, cuando está destinada al ser humano, comprende preferentemente una cantidad de extracto de *Vaccinium myrtillus* que permite la administración de por lo menos 0,00001 g, en particular entre 0,00001 g y 0,60 g, de extracto de *Vaccinium myrtillus* por kg de peso corporal de la persona a la que se administra la composición y al día.

De manera preferida, el extracto de *Vaccinium myrtillus* comprende por lo menos una molécula seleccionada de

entre un ácido monocateoilquínico, delfinidina-3-galactósido, delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, delfinidina-3-arabinósido, cianidina-3-glucósido, petunidina-3-galactósido, cianidina-3-arabinósido, petunidina-glucósido, peonidina-3-galactósido, petunidina-3-arabinósido, peonidina-3-glucósido, malvidina-3-galactósido, malvidina-3-glucósido, malvidina-3-arabinósido, o sus análogos. Preferentemente, el extracto comprende por lo menos un ácido monocateoilquínico.

La piperina presente en la composición según la invención puede estar contenida en un extracto de *Piper* o ser una piperina sintética.

La fórmula topológica de la piperina es la siguiente:



La composición según la invención, cuando está destinada al ser humano, comprende preferentemente una cantidad de piperina que permite la administración de por lo menos 0,001 mg, en particular entre 0,001 mg y 166 mg, de piperina por kg de peso corporal de la persona a la que se administra la composición y al día.

Si la piperina está contenida en un extracto de *Piper*, la mezcla de la composición según la invención comprende dicho extracto. El extracto de *Piper* es preferentemente un extracto de *Piper nigrum*, de *Piper aduncum* y/o de *Piper longum*.

El extracto de *Piper* es preferentemente un extracto de frutos o de hojas.

Puede tratarse en particular de un extracto hidroalcohólico o acuoso o CO<sub>2</sub> subcrítico o H<sub>2</sub>O subcrítico o asociado a un tratamiento térmico realizado mediante calentamiento clásico o con frecuencia de microondas o con ultrasonidos.

La razón de planta/extracto está preferentemente comprendida entre 1/1 y 10000/1, en particular entre 1/1 y 200/1.

El extracto comprende preferentemente por lo menos el 1% de piperina en peso con respecto al peso total del extracto.

Además, la mezcla de la composición según la invención comprende preferentemente:

- por lo menos piperina, y
- por lo menos una molécula elegida del 7-O-glucurónido de apigenina, la crisantelina A, la crisantelina B, el ácido cafeico, la luteolina, la maritimina, el eriodictiol, la isookanina, la apigenina, luteolina-7-O-glucósido, la maritimina, la mareína, eriodictiol-7-O-glucósido, la flavomareína, el 8-C- $\alpha$ -L-arabinósido-6-C- $\beta$ -D-glucósido de apigenina (shaftósido), apigenina-6,8-C-di- $\beta$ -D-glucopiranosido (vicenina 2), o sus análogos, preferentemente el 7-O-glucurónido de apigenina, y
- por lo menos una molécula seleccionada de entre un ácido dicafeoilquínico, un ácido sulfomonocateoilquínico, la luteolina, luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucurónido, apigenina-7-O-glucósido, la cinaropicrina, o sus análogos, preferentemente un ácido dicafeoilquínico, y
- por lo menos una molécula seleccionada de entre un ácido monocateoilquínico, delfinidina-3-galactósido, delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, delfinidina-3-arabinósido, cianidina-3-glucósido, petunidina-3-galactósido, cianidina-3-arabinósido, petunidina-glucósido, peonidina-3-galactósido, petunidina-3-arabinósido, peonidina-3-glucósido, malvidina-3-galactósido, malvidina-3-glucósido, malvidina-3-arabinósido, o sus análogos, preferentemente por lo menos un ácido monocateoilquínico, y
- por lo menos una molécula seleccionada de entre la oleuropeína y el hidroxitirosol

Además de los extractos de *Chrysanthellum indicum*, de *Cynara scolymus*, de *Vaccinium myrtillus*, de *Olea europaea* y de la piperina, la mezcla según la invención también puede contener otros compuestos.

El extracto de *Olea europaea* es preferentemente un extracto de hojas o de frutos.

Puede tratarse en particular de un extracto hidroalcohólico o acuoso o CO<sub>2</sub> subcrítico o H<sub>2</sub>O subcrítico o asociado a un tratamiento térmico realizado mediante calentamiento clásico o con frecuencia de microondas o con ultrasonidos.

La razón de planta/extracto está preferentemente comprendida entre 1/1 y 200/1, en particular entre 1/1 y 60/1.

5 La composición según la invención, cuando está destinada al ser humano, comprende preferentemente una cantidad de extracto de *Olea europaea* que permite la administración de por lo menos 0,00001 g, en particular entre 0,00001 g y 0,60 g, de extracto de *Olea europaea* por kg de peso corporal de la persona a la que se administra la composición y al día.

10 De manera preferida, el extracto de *Olea europaea* comprende por lo menos una molécula seleccionada de entre la oleuropeína y el hidroxitirosol, o sus análogos.

15 Por mezcla en el contexto de la invención se entiende la asociación de sustancias (extractos y/o moléculas) en forma sólida, líquida o gaseosa que pueden o no interactuar químicamente. La mezcla de extractos según la invención se obtiene mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia. Puede obtenerse mediante simple mezclado de los constituyentes.

Preferentemente, la razón extracto de *Chrysanthellum indicum*/extracto de *Cynara scolymus*/extracto de *Vaccinium myrtillus*/piperina en la mezcla está comprendida entre 0,01/0,01/0,01/0,0001 y 10/10/10/10.

20 Según una variante, además de la mezcla constituida por varios extractos de plantas o en lugar de la mezcla constituida por varios extractos de plantas, la mezcla de moléculas de la composición según la invención puede comprender por lo menos:

- 25 - un extracto único obtenido a partir de una mezcla de por lo menos dos plantas seleccionadas de entre *Chrysanthellum indicum*, *Cynara scolymus*, *Olea europaea*, *Vaccinium myrtillus* y *Piper* y eventualmente
- un extracto de *Chrysanthellum indicum* si la mezcla de plantas del extracto único no comprende *Chrysanthellum indicum*,
- 30 - un extracto de *Cynara scolymus* si la mezcla de plantas del extracto único no comprende *Cynara scolymus*,
- un extracto de *Vaccinium myrtillus* si la mezcla de plantas del extracto único no comprende *Vaccinium myrtillus*,
- 35 - un extracto de *Olea europaea* si la mezcla de plantas del extracto único no comprende *Olea europaea*,
- piperina o un extracto de *Piper* si la mezcla de plantas del extracto único no comprende *Piper*.

Preferentemente, cuando la composición comprende un extracto único, comprende:

- 40 - un extracto único obtenido a partir de por lo menos *Chrysanthellum indicum*, *Cynara scolymus*, *Olea europaea* y *Vaccinium myrtillus* y *Piper*, y/o
- 45 - piperina y un extracto único obtenido a partir de por lo menos *Chrysanthellum indicum*, *Cynara scolymus*, *Olea europaea* y *Vaccinium myrtillus*.

50 Por extracto único obtenido a partir de varias plantas "X" o materias primas vegetales "X" en el sentido de la invención, se entiende un conjunto de moléculas obtenido a partir de una mezcla de por lo menos dos plantas "X" mediante cualquier procedimiento adaptado. Se pueden citar en particular los extractos acuosos (obtenidos con la ayuda de un disolvente acuoso), alcohólicos (obtenidos con la ayuda de un di solvente alcohólico) o utilizando un disolvente orgánico, o con la ayuda de un cuerpo graso natural o una mezcla de cuerpos grasos naturales, en particular un aceite vegetal o una mezcla de aceites vegetales. Por "disolvente acuoso" se entiende cualquier disolvente constituido totalmente o en parte por agua. Se puede citar así el agua, los disolventes hidroalcohólicos en cualquier proporción o también los disolventes constituidos por agua y por un compuesto como la glicerina o el propilenglicol en cualquier proporción. Entre los disolventes alcohólicos, se puede citar en particular el etanol.

60 Por planta o material prima vegetal en el sentido de la invención, se entiende la planta completa o la parte de una planta, incluidos los cultivos de células, que todavía no ha sufrido ningún tratamiento específico y destinada a entrar en la fabricación de una preparación de planta.

El extracto único de una mezcla de plantas "X" puede ser obtenido mediante cualquier procedimiento adaptado, por ejemplo mediante un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- 65 - extracción sólido/líquido
- separación/prensado
- filtración

- evaporación
- secado
- evidentemente incorporación de aditivos
- homogeneización
- acondicionamiento.

5

Se utiliza preferentemente toda la planta o las partes aéreas de *Chrysanthellum indicum* como materia prima vegetal para obtener el extracto único. El extracto único se realiza preferentemente a partir de por lo menos 0,1% de toda la planta o de las partes aéreas de *Chrysanthellum indicum* en peso con respecto al peso total de la mezcla de plantas utilizada para realizar el extracto único.

10

Se utiliza preferentemente las hojas o las raíces de *Cynara scolymus* como materia prima vegetal para obtener el extracto único. El extracto único se realiza preferentemente a partir de por lo menos 0,1% de hojas o de raíces de *Cynara scolymus* en peso con respecto al peso total de la mezcla de plantas utilizada para realizar el extracto único. Se utilizan preferentemente los frutos o las hojas de *Vaccinium myrtillus* como materia prima vegetal para obtener el extracto único. El extracto único se realiza preferentemente a partir de por lo menos 0,1% de frutos o de hojas de *Vaccinium myrtillus* en peso con respecto al peso total de la mezcla de plantas utilizada para realizar el extracto único. Si el extracto único se obtiene a partir de una mezcla de plantas que comprende *Piper*, se utilizan preferentemente los frutos o las hojas de *Piper nigrum*, de *Piper aduncum* y/o de *Piper longum* como materia prima vegetal para obtener el extracto único. El extracto único se realiza preferentemente a partir de por lo menos 0,0001% de frutos o de hojas de *Piper nigrum* y/o de *Piper aduncum* y/o de *Piper longum* en peso con respecto al peso total de la mezcla de plantas utilizada para realizar el extracto único.

15

20

25

El extracto único puede comprender así, además de las otras moléculas, por lo menos la oleuropeína, el hidroxitirosol y/o por lo menos piperina.

Preferentemente, el extracto único comprende:

- por lo menos una molécula seleccionada de entre la apigenina-7-O-glucurónido, la crisantelina A, la crisantelina B, el ácido cafeico, la luteolina, la maritimina, el eriodictiol, la isookanina, la apigenina, la luteolina-7-O-glucósido, la maritimina, la mareína, el eriodictiol-7-O-glucósido, la flavomareína, la apigenina-8-C- $\alpha$ -L-arabinósido-6-C- $\beta$ -D-glucósido (shaftósido), la apigenina-6,8-C-di- $\beta$ -D-glucopiranosido (vicenina-2), o sus análogos, preferentemente la apigenina-7-O-glucurónido, y
- por lo menos una molécula seleccionada de entre un ácido dicafeoilquínico, un ácido sulfomonocafeoilquínico, la luteolina, la luteolina-7-O-glucósido, la luteolina-7-O-glucurónido, la apigenina-7-O-glucósido, la cinaropicrina, o sus análogos, preferentemente un ácido dicafeoilquínico, y
- por lo menos una molécula seleccionada de entre un ácido monocafeoilquínico, la delfinidina-3-galactósido, la delfinidina-3-glucósido, la cianidina-3-galactósido, la delfinidina 3-arabinósido, la cianidina-3-glucósido, la petunidina-3-galactósido, la cianidina-3-arabinósido, la petunidina-3-glucósido, la peonidina-3-galactósido, la petunidina-3-arabinósido, la peonidina-3-glucósido, la malvidina-3-galactósido, la malvidina-3-glucósido, la malvidina-3-arabinósido, o sus análogos, preferentemente por lo menos un ácido monocafeoilquínico, y
- por lo menos una molécula seleccionada de entre la oleuropeína y el hidroxitirosol, y
- piperina.

30

35

40

45

50

Se utilizan preferentemente las hojas o los frutos de *Olea europaea* como materia prima vegetal para obtener el extracto único. El extracto único se realiza preferentemente a partir de por lo menos 0,1% de hojas o de frutos de *Olea europaea* en peso con respecto al peso total de la mezcla de plantas utilizada para realizar el extracto único.

55

Un modo de realización particularmente adaptado es una composición que comprende un extracto único obtenido a partir de *Chrysanthellum indicum*, *Cynara scolymus*, *Vaccinium myrtillus*, *Piper* y *Olea europaea*.

La composición según la invención que comprende un extracto único, cuando está destinada al ser humano, comprende preferentemente una cantidad de extracto único que corresponde a una administración de por lo menos 0,00001 g, en particular entre 0,00001 g y 0,60 g de extracto único por kg de peso corporal de la persona a la que se administra la composición y por día. La composición según la invención que comprende unos extractos de plantas y/o uno o varios extracto(s) único(s) comprende por lo tanto:

60

65

- por lo menos una molécula seleccionada de entre 7-O-glucurónido de apigenina, la crisantelina A, la crisantelina B, el ácido cafeico, la luteolina, la maritimina, el eriodictiol, la isookanina, la apigenina, luteolina-7-O-glucósido, la maritimina, la mareína, eriodictiol-7-O-glucósido, la flavomareína, el 8-C- $\alpha$ -L-



arabinósido-6-C-β-D-glucósido de apigenina (shaftósido), apigenina-6,8-C-di-β-D-glucopiranosido (vicenina 2), o análogos, preferentemente el 7-O-glucurónido de apigenina, y

- 5 - de un ácido dicafeoilquínico, un ácido sulfo-monocafeoilquínico, la luteolina, luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucurónido, apigenina-7-O-glucósido, la cinaropicrina, o sus análogos, preferentemente un ácido dicafeoilquínico, y
- 10 - por lo menos una molécula seleccionada de entre un ácido monocafeoilquínico, delfinidina-3-galactósido, delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, delfinidina-3-arabinósido, cianidina-3-glucósido, petunidina-3-galactósido, cianidina-3-arabinósido, petunidina-glucósido, peonidina-3-galactósido, petunidina-3-arabinósido, peonidina-3-glucósido, malvidina-3-galactósido, malvidina-3-glucósido, malvidina-3-arabinósido, o sus análogos, preferentemente por lo menos un ácido monocafeoilquínico, y
- 15 - por lo menos piperina, y
- y por lo menos una molécula seleccionada de entre la oleuropeína, el hidroxitirosol, o sus análogos.

Según otro aspecto, la invención también se refiere a una composición que comprende una mezcla de por lo menos cuatro moléculas, pudiendo estas moléculas ser moléculas sintéticas y/o moléculas naturales, en particular procedentes de materias primas vegetales:

- 25 - seleccionándose por lo menos una molécula del 7-O-glucurónido de apigenina, la crisantelina A, la crisantelina B, el ácido cafeico, la luteolina, la maritimetina, el eriodictiol, la isookanina, la apigenina, luteolina-7-O-glucósido, la maritiméina, la mareína, eriodictiol-7-O-glucósido, la flavomareína, el 8-C-α-L-arabinósido-6-C-β-D-glucósido de apigenina (shaftósido), apigenina-6,8-C-di-β-D-glucopiranosido (vicenina 2), o sus análogos, y
- 30 - seleccionándose por lo menos una molécula de un ácido dicafeoilquínico, un ácido sulfo-monocafeoilquínico, la luteolina, luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucurónido, apigenina-7-O-glucósido, la cinaropicrina, o sus análogos, y
- 35 - seleccionándose por lo menos una molécula de un ácido monocafeoilquínico, delfinidina-3-galactósido, delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, delfinidina-3-arabinósido, cianidina-3-glucósido, petunidina-3-galactósido, cianidina-3-arabinósido, petunidina-glucósido, peonidina-3-galactósido, petunidina-3-arabinósido, peonidina-3-glucósido, malvidina-3-galactósido, malvidina-3-glucósido, malvidina-3-arabinósido, o sus análogos, y
- 40 - por lo menos una molécula seleccionada de entre la oleuropeína, el hidroxitirosol, o sus análogos, y
- por lo menos piperina.

Por lo menos una de las tres primeras moléculas es una molécula sintética. En efecto, independientemente de la piperina que puede ser sintética o natural, por lo menos una de las otras moléculas es una molécula sintética.

45 Según una variante particularmente adaptada, la mezcla comprende por lo menos un ácido dicafeoilquínico, el 7-O-glucurónido de apigenina, un ácido monocafeoilquínico, piperina y la oleuropeína. La mezcla de moléculas de la composición según la invención puede estar constituida exclusivamente por un ácido dicafeoilquínico, 7-O-glucurónido de apigenina, un ácido monocafeoilquínico, piperina y oleuropeína.

50 Según otras variantes, las composiciones según la invención pueden comprender una mezcla de extracto(s) y de molécula(s) de interés presentes en la presente solicitud (por ejemplo un extracto de *Chrysanthellum indicum*) y por lo menos una molécula que se elige de un ácido dicafeoilquínico, un ácido sulfo-monocafeoilquínico, la luteolina, luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucurónido, apigenina-7-O-glucósido, la cinaropicrina, o sus análogos, y por lo menos una molécula que se elige de un ácido monocafeoilquínico, delfinidina-3-galactósido, delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, delfinidina-3-arabinósido, cianidina-3-glucósido, petunidina-3-galactósido, cianidina-3-arabinósido, petunidina-glucósido, peonidina-3-galactósido, petunidina-3-arabinósido, peonidina-3-glucósido, malvidina-3-galactósido, malvidina-3-glucósido, malvidina-3-arabinósido, o sus análogos y por lo menos de la piperina, etc.)

60 Las composiciones según la invención en sus diferentes variantes pueden estar constituidas exclusivamente por los elementos descritos (extractos de planta y/o extracto(s) único(s) y/o mezcla de por lo menos cuatro moléculas), o pueden comprender también por lo menos un elemento complementario (productos, moléculas, extractos, principios activos, excipientes, etc.) añadido además de los extractos de planta y/o del o de los extractos únicos o de la mezcla de por lo menos cuatro moléculas, pudiendo seleccionarse dicho elemento complementario de:

- 65 - las siguientes vitaminas: B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12 C, A, D, E, K1 y K2;

- 5 - los siguientes compuestos: ácido obeticólico, ácido corosólico, ácidos grasos poliinsaturados de la familia de los omega 6 y/o omega 3, ácido orótico, ácido pangámico, ácido para-amino-benzoico, amigdalina, beta-glucanos, carnitina, dimetilglicina, imeglimina, isoflavonas, L-arginina, oxitocina, pectina, piridoxamina, resveratrol, viniferina, L-citrulina;
- 10 - los siguientes oligoelementos y minerales: arsénico, boro, calcio, cobre, hierro, fluoro, yodo, litio, manganeso, magnesio, molibdeno, níquel, fósforo, selenio, vanadio, cinc;
- 15 - los siguientes microconstituyentes de carácter no indispensable: ácido linolénico conjugado, ácido lipoico, carotenoides, carnitina, colina, coenzima Q10, fitoesteroles, polifenoles de la familia de los taninos y de los lignanos, taurina;
- 20 - fructooligosacáridos, de los galactooligosacáridos;
- fermentos lácticos;
- levaduras, por ejemplo levadura de arroz rojo (*Monascus purpureus*);
- 25 - hongos, por ejemplo el maitake;
- los productos derivados de insectos compatibles con el sector alimentario y farmacéutico;
- la marihuana y el hachís;
- 30 - agentes de recubrimiento: por ejemplo la hipromelosa, la celulosa microcristalina, el ácido esteárico, talco, azúcar, goma laca, povidona, cera de abeja;
- aromas: por ejemplo aroma natural de arándano o aroma natural de fresa;
- 35 - acidificantes tales como el ácido málico;
- antiaglomerantes: por ejemplo el dióxido de silicio o el estearato de magnesio;
- 40 - espesantes tales como la goma de xantana, la sílice coloidal, los mono y diglicéridos de ácidos grasos;
- estabilizantes tales como el fosfato de calcio;
- 45 - emulsionantes tales como la lecitina de soja;
- 50 - agentes de carga tales como el almidón de maíz;
- excipientes: por ejemplo celulosa microcristalina, estearato de magnesio o fosfato de dicalcio.
- 55 Las composiciones según la invención también pueden comprender uno o varios extractos de por lo menos una de las siguientes materias primas vegetales y/o una o varias moléculas contenidas en por lo menos una de las materias vegetales siguientes y/o el extracto único puede ser obtenido asimismo a partir de por lo menos una de las materias primas vegetales siguientes: *Abelmoschus esculentus*, *Abies Alba*, *Abies balsamea*, *Abies sibirica*, *Acacia nilotica*, *Acacia senegal*, *Achillea millefolium*, *Achyranthes bidentata*, *Acmella oleracea*, *Actaea racemosa*, *Actinidia chinensis*, *Actinidia deliciosa*, *Adansonia digitata*, *Adiantum capillus-veneris*, *Aesculus hippocastanum*, *Afromomum melegueta*, *Agathosma betulina*, *Agathosma crenulata*, *Agathosma serratifolia*, *Agrimonia eupatoria*, *Ajuga reptans*, *Albizia julibrissin*, *Alchemilla vulgaris*, *Alliaria petiolata*, *Allium ampeloprasum*, *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Allium schoenoprasum*, *Allium ursinum*, *Alnus glutinosa*, *Aloe ferox*, *Aloe vera*, *Aloysia citriodora*, *Alpinia galanga*, *Alpinia hainanensis*, *Alpinia officinarum*, *Alpinia oxyphylla*, *Althaea officinalis*, *Ammi visnaga*, *Amorphophallus konjac*, *Ananas comosus*, *Andrographis paniculata*, *Anemarrhena asphodeloides*, *Anethum graveolens*, *Angelica archangelica*, *Angelica dahurica*, *Angelica pubescens*, *Angelica sinensis*, *Antennaria diocia*, *Anthriscus cerefolium*, *Anthyllis vulneraria*, *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs, *Apium graveolens*, *Arachis hypogaea*, *Aralia elata*, *Arctium lappa*, *Arctium minus*, *Argania spinosa*, *Armorica rustanica*, *Artemisia dracunculus*, *Artemisia vulgaris*, *Ascophyllum nodosum*, *Aspalathus linearis*, *Asparagus officinalis*, *Astragalus membranaceus*, *Atractylodes lancea*, *Atractylodes macrocephala*, *Auracaria columnaris*, *Avena staiva*, *Ayahuasca*, *Baccharis genistelloides*, *Bacopa monnieri*, *Ballota nigra*, *Bambusa bambos*, *Bellis perennis*, *Berberis vulgaris*, *Beta vulgaris*, *Betula alleghaniensis*, *Betula pendula*, *Betula pubescens*, *Bixa orellana*, *Borago officinalis*, *Boswellia serrata*, *Brassica napus*, *Brassica nigra*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Bupleurum chinense*, *Calendula officinalis*, *Calluna vulgaris*, *Camellia sinesis*, *Capsella bursa-pastoris*, *Capsicum annum*, *Carex arenaria*, *Carica papaya*, *Carlina acaulis*, *Carphephorus odoratissimus*, *Carpinus betulus*, *Carthamus tinctorius*, *Carum carvi*, *Cassia fistula*, *Castanea sativa*, *Centaurea centaurium*, *Centaurea cyanus*, *Centaureum erythraea*, *Centella asiatica*, *Cerasus*

*vulgaris, Ceratonia siliqua, Chaenomelum nobile, Chlorella vulgaris, Chondrus crispus, Chrysanthellum indicum, Cichorium intybus, Cinchona officinalis, cinchona pubescens, Cinnamomum camphora, Cinnamomum cassia, Cinnamomum verum, Cistanche salsa, Cistus incanus, Citrus aurantium, Citrus limon, Citrus maxima, Citrus medica, Citrus myrtifolia, Citrus reticulata blanco, Citrus sinensis, Citrus paradisi, Clinopodium vulgare, Cnicus benedictus, Cochlearia officinalis, Cocos nucifera, Codonopsis pilosula, Coffea canephora, Coix lacryma-jobi var. mayyuen Stapf, Cola acuminata, Cola ballayi cornu, Cola nitida, Combretum micranthum, Commiphora mukul, Conyza canadensis, Coriandrum sativum, Cornus officinalis, Corylus avellana, Corymbia citriodora, Crataegus laevigata, Craetegus monogyna, Crithmum maritimum, Crocodylus sativus, Cucumis melo, Cucurbita pepo, Cuminum cyminum, Cupressus sempervirens, Cuscuta chinensis, Cyamopsis tetragonoloba, Cyathula officinalis, Cyclanthera pedata, Cydonia oblonga, Cymbopogon martini, Cymbopogon nardus, Cymbopogon winterianus, Cynara cardunculus, Cyperus rotundus, Daucus carota, Dendranthema grandiflorum, Desmodium adscendens, Dimocarpus longan, Dioscorea oppositifolia, Dioscorea villosa, Diospyros kaki Thunb., Dunaliella salina, Echinacea augustifolia, Echinacea pallida, Echinacea purpurea, Elaeagnus rhamnoides, Alettaria cardamomum, Eleutherococcus senticosus, Elymus repens, Epiobium augustifolium, Epilobium parviflorum, Equisetum arvense, Erica cinerea, Erica tetralix, Eriobotrya japonica, Eriodictyon californicum, Erodium cicutarium, Eryngium campestre, Eschscholzia californica, Eucalyptus dives Schauer, Eucalyptus globulus, Eucalyptus radiata, Eucalyptus smithii F. Muell, Eucommia ulmoides, Eugenia uniflora, Eugenia jambolana, Euphrasia stricta D. Wolff Euterpe oleracea, Fagopyrum esculentum Moench, Follopia japonica, Ferula assa-foetida, Ficus carica, Filipendula ulmaria, Foeniculum vulgare Mill., Forsythia suspensa, Fragaria dodonei Ard., Frangula purshiana Cooper, Fraxinus excelsior, Fraxinus ortus, Fucus serratus, Fucus vesiculosus, Fumaria officinalis, Galeopsis segetum Neck., Galium odotarium, Galium verum, Gardenia jasminoides J. Ellis, Gastrodia elata Blume, Gelidium corneum J.V. Lamouroux, Gentiana lutea, Geranium robertianum, Geum urbanum, Ginkgo biloba, Glycine max, Glycyrrhiza glabra, Glycyrrhiza uralensis, Gracilaria gracilis, Grindelia camporum Greene, Grindelia robusta Nutt., Grindelia squarrosa Dunal, Gymnema sylvestris, Haematococcus pluvialis, Hamamemis virginiana, Harpagophytum procumbens, Harpagophytum zeyheri Decne., Hedeoma pluegoides Pers., Helianthus annuus, Helianthus tuberosus, Helichrysum arenarium, Helichrysum stoechas, Herniaria glabra, Hibiscus sabdariffa, Hieracium pilosella, Himanthalia elongata, Hordeum vulgare, Houltuyria cordata Thunb., Huperzia serrata, Hyssopus officinalis, Ilex paraguayensis A. St.-Hill, Illicium verum, Impatiens balsamina, Inula britannica, Inula helenium, Jasminum grandiflorum, Jasminum officinale, Juniperus communis, Justicia adhatoda, Kavalama urens, Krameria lappacea, Lagerstroemia speciosa, Laminaria digitata, Laminaria hyperborea, Lamium album, Larix decidua, Larix occidentalis, Laurus nobilis, Lavandula augustifolia, Lavandula latifolia, Ledum palustre, Leonurus cardiaca, Lepidium meyenii Walp., Lepidium sativum, Lespedeza capitata, Levisticum officinale, Lindera aggregata, Linus usitatissimum, Liquidambar styraciflua, Lotus corniculatus, Lycium chinense, Lycium barbarum, Lycopersicon esculentum, Lycopodium clavatum, Lycopus europaeus, Lythrum salicaria, Macadamia ternifolia F. muell, Macrocystis pyrifera, Magnolia officinalis, Malpighia glabra, Malus pumila, Malus domestica, Malus sylvestris, Malva sylvestris, Mangifera indica, Maranta arundinacea, Marrubium vulgare, Marsdenia cundurango, Marsdenia sylvestris, Mastocarpus stellatus, Matricaria chamomilla, Medicago sativa, Melaleuca alternifolia, Melaleuca cajuputi Powell, Melaleuca leucadendra, Melaleuca quinquevia, Melaleuca viridiflora, Melilotus altissimus Thuill., Melilotus officinalis, Mentha arvensis, Mentha x piperita, Menyanthes trifoliata, Mesembryanthemum crystallinum, Monarda didyma, Morinda citrifolia, Morinda officinalis, Morus alba, Morus nigra, Murraya koenigii, Musa x paradisiaca, Myrciaria dubia, Myristica flagrans Houtt., Myroxylon balsamum, Myrtus communis, Nardostachys jatamansi, Nasturtium officinale R. Br., Nelumbo nucifera Gaertn., Nepeta cataria, Nepeta tenuifolia Benth., Nigella sativa, Ocimum basilicum, Oenothera biennis, Ononis spinosa, ophiopogon japonicus, Opuntia ficus-indica, Origanum compactum Benth., Origanum majorana, Origanum vulgare, Orthosiphon aristatus, Oryza sativa, Paeonia lactiflora, Paeonia x suffruticosa Andrews, Palmaria palmata, Panax ginseng, Panax quinquefolius, Panicum miliacium, Papaver rhoeas, Parietaria officinalis, Passiflora edulis Sims, Pastinaca sativa, Paullinia cupana Kunth, Pelargonium graveolens, Perilla frutescens, Persea americana, Persicaria bistorta, Persicaria maculosa Gray, Petroselinum crispum, Peucedanum ostruthium, Peumus boldus Molina, Phaseolus vulgaris, Phellodendron amurense, Photinia melancarpa, Phyllanthus emblica, Physalis alkekengi, Phymatolithon calcareum, Picea abies, Pimenta dioca, Pimenta racemosa, Pimpinella anisum, Pimpinella major, Pimpinella saxifraga, Pinus mugo Turra, Pinus pinaster Aiton, Pinus sylvestris, Pistacia lentiscus, Plantago arenaria, Plantago lanceolata, Plantago major, Plantago ovata, Platycodon grandiflorus, Plectranthus barbatus Andrews, Pogostemon cablin, Polygala senega, Polygala sibirica, Polygala tenuifolia Willd., Polygonum aviculare, Populus nigra, Populus tremula, Populus tremuloides, Porphyra umbilicalis, Portulaca oleracea, Potentilla erecta, Primula veris, Prunella vulgaris, Prunus africana, Prunus armeniaca, Ribes nigrum, Ribes uva-crispa, Rosa canina, Rosa gallica, Rosa moschata, Rosa rubiginosa, Rosmarinus officinalis, Rubus caesius, Rubus fruticosus, Rubus idaeus, Rumex acetosa, Rumex acetosella, Rumex crispus, Rumex patientia, Ruscus aculeatus, Sachcharina japonica, Saccharina latissima, Salix alba, Salix fragilis, Salix pentandra, Salix purpurea, Salvia officinalis L., Salvia officinalis subesp. lavandulifolia Gams, Salvia sclarea, Sambucus nigra, Sanguisorba officinalis, Sanicula elata Buch.-Ham. Ex D. Don, Santalum album, Santolina chamaecyparissus, Saposchnikovia divaricata, Sargassum fusiforme, Satureja hortensis, Satureja montana, Saussurea costus, Scrophularia ningpoensis Helmsl., Scutellaria baicalensis Georgi, Secale cereale, Sedum acre, Sedum roseum, Senna alexandrina Mill., Senna obtusifolia, Smilax cordifolia Humb. & Bonpl., Smilax glabra Roxb., Smilax officinalis Kunth, Smilax purhampuy Ruiz, Smilax purhampuy Ruiz, Smilax regelli Killip et C.V. Morton, Smilax vanillidora Apt, Solanum melongena, Solanum tuberosum, Solidago virgaurea, Sorbus aucuparia, Spatholobus suberctus Dunn., Spinacia oleracea, Spirulina major Kützing, Spirulina maxima Geitler, Spirulina platensis Geitler, Stavhys officinalis, Stemmecantha carthamoides Dittrich, Stypholobium*

*japonicum, Syzgium aromaticum, Tagetes erecta, Tamarindus indica, Tanacetum parthemium, Terminalia chebula Retz., Theobroma cacao, Thymus saturejoides Coss., Thymus serpyllum, Thymus vulgaris, Thymus zygis, Tilia cordata Mill., Tilia platyphyllos Scop., Tilia tomentosa Moench, Tilia euopaea, Tribulus terrestris, Trichosanthes kirilowii Maxim., Trifolium arvense, Trifolium campestre Schreb., Trifolium pratense, Trifolium repens, Trigonella caerulea, Trigonella foenum-graecum, Triticum aestivum, Triticum durum Desf., Triticum spelta L., Triticum turgidum, Tropaeolum majus, Turnera diffusa Willd., Ulmus glabra Huds., Ulmus glabra Huds., Ulmus pumila, Ulmus rubra Muhl., Ulva lactuca, Uncaria gambir Roxb., Uncaria rhynchophylla Miq., Uncaria tomentosa DC., Undaria pinnatifida Suringar, Urtica dioica, Urtica urens, Vaccinium macrocarpon, Vaccinium oxycoccos, Vaccinium vitis-idae, Valeriana jatamansi Jones, Valeriana officinalis, Vanilla planifolia Jacks, Verbascum densiflorum Bertol., Verbascum thapsus, Verbena officinalis, Veronica officinalis, Viburnum opulus, Vigna angularis Ohwi & H. Ohashi, Vinca major, Vinca minor, Viola palustris, Viola tricolor, Vitex agnus-castus, Vitex trifolia, Vitis vinifera, Zea mays, Zingiber officinale Roscoe, Ziziphus jujuba Mill.*

15 Las composiciones según la invención pueden presentarse en cualquier forma, en particular en forma de polvo, de gel, de emulsión o en forma líquida, en particular en forma de comprimidos, cápsulas ("capsules"), cápsulas duras ("gélules"), barras ("sticks"), sobres, ampollas, cuentagotas o en forma inyectable.

20 Las composiciones según la invención pueden utilizarse como productos de nutrición o producto de salud en particular como medicamento.

Por producto de nutrición se entiende todos los productos que presentan un efecto nutricional y/o fisiológico, esto comprende en particular los complementos alimentarios, los alimentos, los productos dietéticos, etc. Estos productos pueden administrarse en particular por vía oral, gástrica o venosa.

25 Por producto de salud se entiende todos los productos que presentan un efecto beneficioso para la salud, en prevención o en tratamiento, ya sea ese efecto fisiológico o farmacológico, en particular los medicamentos, los productos farmacéuticos. Estos productos pueden administrarse en particular por vía oral, gástrica, venosa o cutánea.

30 Las composiciones según la invención pueden utilizarse para prevenir y/o luchar contra los desajustes del metabolismo glucídico y/o lipídico en el ser humano o el animal.

35 Están adaptadas particularmente para prevenir y/o luchar contra la diabetes tipo 2 en el ser humano o el animal. En efecto, permiten impedir la instauración de una hiperglucemia crónica, disminuir la glucemia en ayunas y la hemoglobina glicosilada, los triglicéridos en circulación y hepáticos, la masa corporal y la masa grasa, aumentar el colesterol-HDL ("colesterol bueno") y mejorar la tolerancia a los glúcidos ingeridos y la sensibilidad a la insulina. Pueden utilizarse en prevención del tratamiento de la diabetes tipo 2 y en primera línea, durante la instauración de las MHD, permitiendo así retrasar la instauración de las moléculas antidiabéticas orales habituales. También son particularmente adaptadas para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y de sus complicaciones, en particular esteatosis hepática no alcohólica (NASH), solas o en asociación con otros tratamientos farmacológicos.

45 Las composiciones según la invención también pueden utilizarse en la prevención y/o la lucha contra la diabetes tipo 1 y/o las enfermedades del hígado graso no alcohólico, en particular la esteatosis hepática no alcohólica (NASH), y/o las patologías cardiovasculares, en particular las cardiopatías coronarias, las enfermedades cerebrovasculares, las arteriopatías periféricas, las trombosis venosas profundas, y/o las patologías asociadas a una insulinoresistencia tales como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer (Bedse G *et al.* Front Neurosci 2015; 9: 204).

50 Para tales utilizaciones, las composiciones según la invención pueden utilizarse en combinación con por lo menos un agente terapéutico antidiabético seleccionado de entre las biguanidas entre ellas la metformina, los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), los análogos del péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), las tiazolidindionas (TZD), las sulfonilureas, las insulinas rápidas y lentas, los inhibidores de las glucosidasas (acarbose, miglitol, voglibosa), los inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa 2 (SGLT2), las moléculas de la familia del fibrinor tales como el elafibranor, o las moléculas que se dirigen a ("ciblant") los receptores nucleares y en particular los receptores ROR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) y Rev-Erbs ( $\alpha$ ,  $\beta$ ).

Las composiciones según la invención también pueden utilizarse para actuar sobre otros factores del riesgo cardiovascular o del síndrome metabólico.

60 En particular, las composiciones según la invención pueden utilizarse para prevenir y/o luchar contra la dislipidemia. Presentan en particular un efecto hipocolesterolemiante y permiten disminuir la tasa de colesterol total, la tasa de colesterol-LDL, los triglicéridos en circulación y los triglicéridos hepáticos. Presentan además una actividad inhibidora de la HMG-CoA reductasa.

65 Para tales utilizaciones, las composiciones según la invención pueden utilizarse en combinación con un agente terapéutico hipolipemiante elegido de: las estatinas, los fibratos, el ácido nicotínico, las resinas de intercambio

iónico, los inhibidores de la absorción del colesterol, los ácidos grasos poliinsaturados omega 3, el tiadenol, y los agonistas del receptor nuclear FXR (receptor X fernesioide).

5 Finalmente, las composiciones según la invención pueden utilizarse específicamente para prevenir o luchar contra la obesidad y el sobrepeso y/o el síndrome metabólico y/o los problemas patológicos de tensión arterial.

La invención se ilustra a continuación mediante ejemplos de extractos y de composiciones, así como mediante resultados de ensayos que demuestran la eficacia de las composiciones según la invención, no siendo estos ejemplos y ensayos limitativos.

10

## I. Ejemplos

### Ejemplo 1: ejemplo de extracto seco de *Chrysanthellum indicum*

15 Se someten las partes aéreas de la planta, fresca o seca, a una trituración mecánica hasta la obtención de un polvo basto. A continuación se somete este polvo a una etapa de maceración durante de 10 a 24 horas a temperatura ambiente en una mezcla de agua/etanol 70/10, después se somete el conjunto obtenido a una lixiviación en continuo a 50°C en un percolador con una mezcla de agua/etanol 70/10, siendo la razón de planta/extracto de 3/1. A continuación se somete el extracto obtenido a lavados líquido/líquido con la ayuda de un disolvente orgánico no polar tal como el di o el triclorometano. Tras la concentración mediante evaporación a baja presión a 35°C, se obtiene un líquido que, liofilizado durante 24 horas, proporciona un polvo beis soluble en una mezcla de agua/alcohol. Este polvo (extracto seco) puede utilizarse directamente o mezclado en un disolvente apropiado antes de su utilización.

20

### 25 Ejemplo 2: ejemplo de extracto seco de *Vaccinium myrtillus*

Se somete el arándano en forma de polvo, obtenido a partir de frutos de *Vaccinium myrtillus*, a una etapa de maceración durante de 10 a 24 horas a temperatura ambiente en una mezcla de agua/etanol 30/50, después se somete el conjunto obtenido a una lixiviación en continuo a 50°C en un percolador con una mezcla de agua/etanol 30/50, siendo la razón de planta/extracto de 10/1. A continuación se somete el extracto obtenido a lavados líquido/líquido con la ayuda de un disolvente orgánico no polar tal como el di o el triclorometano. Tras la concentración mediante evaporación a baja presión a 35°C, se obtiene un líquido que, liofilizado durante 24 horas, proporciona un polvo de color violeta soluble en una mezcla de agua/alcohol.

30

### 35 Ejemplo 3: ejemplo de extracto seco de *Cynara scolymus*

Se somete la alcachofa en forma de polvo obtenido a partir de hojas de *Cynara scolymus* a una etapa de maceración durante de 10 a 24 horas a temperatura ambiente en agua, después se somete el conjunto obtenido a una lixiviación en continuo a 50°C en un percolador con agua, siendo la razón de planta/extracto de 2/1. A continuación se somete el extracto obtenido a lavados líquido/líquido con la ayuda de un disolvente orgánico no polar tal como el di o el triclorometano. Tras la concentración mediante evaporación a baja presión a 35°C, se obtiene un líquido que, liofilizado durante 24 horas, proporciona un polvo beis soluble en agua.

40

### 45 Ejemplo 4: ejemplo de extracto seco de *Olea europaea*

Se trituran las hojas de olivo, enteras y secadas al aire, a -80°C con la ayuda de un triturador de cuchillas para obtener un polvo fino y homogéneo. A continuación se somete el polvo a una etapa de maceración durante de 10 a 24 horas en una mezcla de agua/etanol 70/30. La etapa se realiza en un sistema cerrado con burbujeo de nitrógeno a temperatura ambiente, o con una potencia de microondas de 800 vatios o con una frecuencia de ultrasonidos de 20 kHz durante 2 x 3 min. A continuación se somete el conjunto obtenido a una lixiviación en continuo a 50°C en un percolador con una mezcla de agua/etanol 70/30, siendo la razón de planta/extracto de 10/1. A continuación se somete el extracto obtenido a lavados líquido/líquido con la ayuda de un disolvente orgánico no polar tal como el di o el triclorometano. Tras la concentración mediante evaporación a baja presión a 35°C, se obtiene un líquido que, liofilizado durante 24 horas, proporciona un polvo de color verde en una mezcla de agua/alcohol.

50

55

### Ejemplo 5: ejemplos de extracto único

60 El *Chrysanthellum* en forma de polvo obtenido a partir de las partes aéreas de *Chrysanthellum indicum*, y la alcachofa en forma de polvo obtenida a partir de las hojas de *Cynara scolymus*, y el arándano en forma de polvo obtenido a partir de frutos de *Vaccinium myrtillus*, y polvo de frutos de *Piper nigrum*, y el olivo en forma de polvo obtenido a partir de las hojas de la *Olea europaea* son sometidos a una etapa de maceración durante 10 a 24 horas a temperatura ambiente en una mezcla 40/60 agua/etanol, y después el conjunto obtenido es sometido a una lixiviación continua a 50°C en un percolador con una mezcla 40/60 agua/etanol, siendo la relación mezcla de plantas/extracto único de 4 a 6 para 1. El extracto obtenido es sometido a continuación a unos lavados líquido/líquido con la ayuda de un disolvente orgánico no polar tal como el di- o el tri-clorometano. Después de la

65

concentración por evaporación a baja presión a 35°C, se obtiene un líquido que, liofilizado durante 24 horas, proporciona un polvo de color violeta soluble en una mezcla agua/alcohol.

**Ejemplo 6: ejemplo de composición según la invención en forma de comprimidos, que comprende cuatro extractos de plantas**

La composición del ejemplo 6 se presenta en forma de comprimidos que pueden administrarse por vía oral. Comprende, expresados en porcentaje en peso, con respecto al peso total de la composición, el 30,1% de extracto seco de partes aéreas de *Chrysanthellum indicum*, el 30,1% de extracto seco de hojas de *Cynara scolymus*, el 3,0% de extracto seco de frutos de *Vaccinium myrtillus* y el 0,3% de extracto seco de frutos de *Piper nigrum*. También comprende excipientes, en particular celulosa microcristalina y estearato de magnesio.

La composición para 3 comprimidos se indica en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Ejemplo de composición en forma de comprimidos

Listado de componentes	Para 3 comprimidos
Extracto seco de partes aéreas de <i>Chrysanthellum indicum</i>	600 mg
Extracto seco de hojas de <i>Cynara scolymus</i>	600 mg
Extracto seco de frutos de <i>Vaccinium myrtillus</i>	60 mg
Extracto seco de frutos de <i>Piper nigrum</i>	6 mg
Celulosa microcristalina	700 mg
Estearato de magnesio	26 mg

**Ejemplo 7: ejemplo de composición según la invención en forma de cápsulas duras, que comprende cinco extractos de plantas**

La composición del ejemplo 7 se presenta en forma de cápsulas duras que pueden administrarse por vía oral. Comprende, expresados en porcentaje en peso, con respecto al peso total de la composición, el 37,0% de extracto seco de partes aéreas de *Chrysanthellum indicum*, el 37,0% de extracto seco de hojas de *Cynara scolymus*, el 3,7% de extracto seco de frutos de *Vaccinium myrtillus*, el 0,004% de extracto seco de frutos de *Piper nigrum*, y el 22,2% de extracto seco de hojas de *Olea europaea*.

La composición para 3 cápsulas duras se indica en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Ejemplo de composición en forma de cápsulas duras

Lista de componentes	Para 3 cápsulas duras
Extracto seco de partes aéreas de <i>Chrysanthellum indicum</i>	200 mg
Extracto seco de hojas de <i>Cynara scolymus</i>	200 mg
Extracto seco de frutos de <i>Vaccinium myrtillus</i>	20 mg
Extracto seco de frutos de <i>Piper nigrum</i>	0,02 mg
Extracto seco de hojas de <i>Olea europaea</i>	120 mg

**Ejemplo 8: ejemplo de composición según la invención en forma de comprimidos, que comprende cinco extractos de plantas**

La composición del ejemplo 8 se presenta en forma de comprimidos que pueden administrarse por vía oral. Comprende, expresados en porcentaje en peso, con respecto al peso total de la composición, el 22,0% de extracto seco de partes aéreas de *Chrysanthellum indicum*, el 22,0% de extracto seco de hojas de *Cynara scolymus*, el 2,2% de extracto seco de frutos de *Vaccinium myrtillus*, el 13,2% de extracto seco de hojas de *Olea europaea*, y el 0,2% de extracto seco de frutos de *Piper nigrum*. La composición también comprende además de la mezcla cinc, las vitaminas B9, PP, B5, H, B12, D, B6, B2, B2 y cromo. También comprende excipientes en particular fosfato de dicalcio, celulosa microcristalina y estearato de magnesio.

La composición para 1 comprimido se indica en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Ejemplo de composición en forma de comprimidos

Listado de componentes	En mg para 1 comprimido	Valor nutricional de referencia para 1 comprimido
Extracto seco de partes aéreas de <i>Chrysanthellum indicum</i>	220,0	-
Extracto seco de hojas de <i>Cynara scolymus</i>	220,0	-
Extracto seco de frutos de <i>Vaccinium myrtillus</i>	22,0	-

Listado de componentes	En mg para 1 comprimido	Valor nutricional de referencia para 1 comprimido
Extracto seco de hojas de <i>Olea europaea</i>	132,0	-
Extracto seco de frutos de <i>Piper nigrum</i>	2,0	-
Fosfato de dicalcio	198,0	-
Celulosa microcristalina	153,44	-
Estearato de magnesio	20,0	-
Bisglicinato de cinc	12,99	33%
Vitamina B9 - ácido fólico	7,30	33%
Vitamina PP - nicotinamida	5,30	33,1%
Vitamina B5 - pantotenato de calcio	2,24	33,3
Vitamina H - biotina	1,66	33,2%
Vitamina B12	0,83	33,2%
Vitamina D3	0,64	32%
Vitamina B6 - clorhidrato de piridoxina	0,56	32,9%
Vitamina B1 - clorhidrato de tiamina	0,48	32,7%
Vitamina B2 - riboflavina	0,45	32,1%
Picolinato de cromo	0,11	32,5%

**Ejemplo 9: ejemplo de composición según la invención en forma de comprimidos, que comprende cuatro extractos de plantas**

- 5 La composición del ejemplo 9 se presenta en forma de comprimidos que pueden administrarse por vía oral. Comprende, expresados en porcentaje en peso, con respecto al peso total de la composición, el 23,9% de extracto seco de plantas enteras de *Chrysanthellum indicum*, el 23,9% de extracto seco de hojas de *Cynara scolymus*, el 23,9% de extracto seco de frutos de *Vaccinium myrtillus* y el 0,2% de extracto seco de frutos de *Piper nigrum*. La composición también comprende vitamina B1, vitamina B3, ácido pantoténico (vitamina B5), cinc y cromo. A modo de excipientes, comprende celulosa microcristalina y fosfato de dicalcio. A modo de agentes de recubrimiento, comprende talco, azúcar, goma laca, povidona y cera de abeja.

10 La composición para 3 comprimidos se indica en la tabla 4 a continuación.

15 Tabla 4. Ejemplo de composición en forma de comprimido

Listado de componentes	Para 3 comprimidos	Valor nutricional de referencia para 3 comprimidos
Extracto seco de frutos de <i>Vaccinium myrtillus</i>	600 mg	-
Extracto seco de plantas enteras de <i>Chrysanthellum indicum</i>	600 mg	-
Extracto seco de hojas de <i>Cynara scolymus</i>	600 mg	-
Extracto seco de frutos de <i>Piper nigrum</i>	5 mg	-
Vitamina B1	1,1 mg	100%
Vitamina B3 (hexanicotinato de inositol)	16 mg (ácido nicotínico)	100%
Ácido pantoténico (vitamina B5)	6 mg	100%
Cinc (bisglicinato de cinc)	5 mg	50%
Cromo (picolinato de cromo)	40 µg	100%
Celulosa microcristalina	600 mg	-
Fosfato de dicalcio	75 mg	-

**Ejemplo 10: ejemplo de composición según la invención en forma de polvo para reconstituir en agua, acondicionada en forma de barras, que comprende cuatro extractos de plantas**

- 20 La composición del ejemplo 10 se presenta en forma de polvo para reconstituir en agua, acondicionada en forma de barras que pueden administrarse por vía oral. Comprende, expresados en porcentaje en peso, con respecto al peso total de la composición, el 36,3% de extracto seco de plantas enteras de *Chrysanthellum indicum*, el 24,2% de extracto seco de raíces de *Cynara scolymus*, el 36,3% de extracto seco de frutos de *Vaccinium myrtillus* y el 2,4% de extracto seco de frutos de *Piper longum*. La composición también comprende vitamina B1, vitamina B3, ácido pantoténico (vitamina B5), cinc y cromo. A modo de aroma, comprende un aroma natural de arándano. A modo de acidificante, comprende ácido málico. A modo de antiaglomerante, comprende dióxido de silicio, a modo de espesante, goma xantana, y a modo de estabilizante, fosfato de calcio.

Su composición se indica en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5. Ejemplo de composición en forma de polvo para reconstituir en agua y acondicionada en forma de *barras*

Listado de componentes	Para 3 barras	Valor nutricional de referencia para 3 barras
Extracto seco de frutos de <i>Vaccinium myrtillus</i>	1500 mg	-
Extracto seco de plantas enteras de <i>Chrysanthellum indicum</i>	1500 mg	-
Extracto seco de raíces de <i>Cynara scolymus</i>	1000 mg	-
Extracto seco de frutos de <i>Piper longum</i>	100 mg	-
Vitamina B1	1,1 mg	100%
Vitamina B3 (hexanicotinato de inositol)	16 mg (ácido nicotínico)	100%
Ácido pantoténico (vitamina B5)	6 mg	100%
Cinc (bisglicinato de cinc)	5 mg	50%
Cromo (picolinato de cromo)	40 µg	100%

**Ejemplo 11: ejemplo de composición según la invención en forma de polvo para reconstituir en agua, acondicionada en forma de barras**

La composición del ejemplo 11 se presenta en forma de polvo para reconstituir en agua, acondicionada en forma de barras que pueden administrarse por vía oral. Comprende, expresados en porcentaje en peso, con respecto al peso total de la composición, el 37,0% de extracto seco de partes aéreas de *Chrysanthellum indicum*, el 37,0% de extracto seco de hojas de *Cynara scolymus*, el 3,7% de extracto seco de frutos de *Vaccinium myrtillus*, el 0,2% de extracto seco de frutos de *Piper nigrum*, y el 22,2% de extracto seco de hojas de *Olea europaea*. La composición también comprende vitamina B12 y cromo. A modo de aroma, comprende un aroma natural de fresa. A modo de antiaglomerante, comprende dióxido de silicio. Esta composición no comprende antiaglomerante ni espesante.

La composición de un producto de este tipo se indica en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6. Ejemplo de composición en forma de polvo para reconstituir en agua y acondicionada en forma de *barras*

Listado de componentes	Para 3 barras	Valor nutricional de referencia para 3 barras
Extracto seco de frutos de <i>Vaccinium myrtillus</i>	120 mg	-
Extracto seco de partes aéreas de <i>Chrysanthellum indicum</i>	1200 mg	-
Extracto seco de hojas de <i>Cynara scolymus</i>	1200 mg	-
Extracto seco de frutos de <i>Piper nigrum</i>	6 mg	-
Extracto seco de hojas de <i>Olea europaea</i>	720 mg	-
Vitamina B3 (hexanicotinato de inositol)	2,5 µg	100%
Cromo (picolinato de cromo)	20 µg	50%

**Ejemplo 12: ejemplo de composición según la invención en forma de cápsulas duras**

La composición del ejemplo 12 se presenta en forma de cápsulas duras que pueden administrarse por vía oral. Comprende, expresados en porcentaje en peso, con respecto al peso total de la composición, el 31,6% de extracto seco de partes aéreas de *Chrysanthellum indicum*, el 47,4% de extracto seco de raíces de *Cynara scolymus*, el 15,8% de extracto seco de frutos de *Vaccinium myrtillus* y el 2,6% de piperina. La composición también comprende vitamina B3 y cinc. A modo de emulsionante, comprende lecitina de soja procedente del sector que no es de OGM, a modo de espesantes, sílice coloidal y mono y diglicéridos de ácidos grasos. La cápsula es una gelatina de pescado, con glicerina y un colorante, el óxido de hierro rojo.

La composición de un producto de este tipo se indica en la tabla 7 a continuación.

Tabla 7. Ejemplo de composición en forma de cápsulas duras

Listado de componentes	Para 2 cápsulas duras	Valor nutricional de referencia para 2 cápsulas duras
Extracto seco de frutos de <i>Vaccinium myrtillus</i>	100 mg	-
Extracto seco de partes aéreas de <i>Chrysanthellum indicum</i>	200 mg	-



Listado de componentes	Para 2 cápsulas duras	Valor nutricional de referencia para 2 cápsulas duras
Extracto seco de raíces de <i>Cynara scolymus</i>	300 mg	-
Piperina	15 mg	-
Vitamina B3	8 mg (ácido nicotínico)	50%
Cinc (gluconato de cinc)	10 mg	100%

**Ejemplo 13: ejemplo de composición según la invención en forma de cápsulas duras**

La composición del ejemplo 13 se presenta en forma de cápsulas duras que pueden administrarse por vía oral. Comprende, expresados en porcentaje en peso, con respecto al peso total de la composición, el 10,4% de extracto seco de plantas enteras de *Chrysanthellum Indicum*, el 20,7% de extracto seco de hojas de *Cynara scolymus*, el 62,1% de extracto seco de hojas de *Vaccinium myrtillus* y el 2,6% de piperina. A modo de agente de carga, comprende almidón de maíz. A modo de antiaglomerantes, comprende dióxido de silicio y estearato de magnesio. La cápsula dura es de origen vegetal.

La composición de un producto de este tipo se indica en la tabla 8 a continuación.

Tabla 8. Ejemplo de composición en forma de cápsulas duras

Listado de componentes	Para 1 cápsula dura	Valor nutricional de referencia para 1 cápsula dura
Extracto seco de hojas de <i>Vaccinium myrtillus</i>	300 mg	-
Extracto seco de plantas enteras de <i>Chrysanthellum indicum</i>	50 mg	-
Extracto seco de hojas de <i>Cynara scolymus</i>	100 mg	-
Piperina	15 mg	-

**Ejemplo 14: ejemplo de composición según la invención en forma de cápsulas duras que comprenden un extracto único**

La composición del ejemplo 14 se presenta en forma de cápsulas duras administrables por vía oral. Comprende un extracto único hidroalcohólico de una mezcla de polvo obtenida a partir de las partes aéreas de *Chrysanthellum indicum*, de hojas *Cynara scolymus*, de frutos de *Vaccinium myrtillus*, de frutos *Piper nigrum* y de hojas de *Olea europaea*. La relación entre las tres plantas es de 1/1/0,1/0,0001/0,6.

El extracto único de la mezcla de plantas se obtiene mediante un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- extracción sólido/líquido
- separación/prensado
- filtración
- evaporación
- secado
- eventualmente incorporación de aditivos
- homogeneización
- acondicionamiento.

**Ejemplo 15: ejemplos de composición según la invención en forma de comprimidos que comprende moléculas sintéticas u obtenidas a partir de materias primas vegetales**

La composición del ejemplo 15 se presenta en forma de comprimidos recubiertos con película que pueden administrarse por vía oral. Comprende como sustancias activas para 1 comprimido: 50 mg de 7-O-glucurónido de apigenina, 50 mg de ácido dicafeoilquinico, 100 mg de ácido monocafeoilquinico, 10 mg de piperina y 250 mg de oleuropeína. Los demás componentes utilizados como excipientes son: almidón pregelatinizado, carboximetilalmidón de sodio (tipo A), ácido esteárico, povidona K90, sílice coloidal anhidra.

Las sustancias activas pueden ser sintéticas o procedentes de materias primas vegetales o procedentes de extractos vegetales mediante purificación por cromatografía en fase líquida de alta resolución.

**II. Evaluación *in vivo* de la eficacia de la composición**

Se realizaron experimentos *in vivo* con ratones para demostrar los efectos de las composiciones según la invención, en particular sobre la glucemia en ayunas, la hemoglobina glicosilada, la tolerancia a los glúcidos, la sensibilidad a la insulina, la masa corporal y la masa grasa, y sobre los lípidos en circulación y hepáticos. Asimismo,

se realizaron evaluaciones de biología molecular. Finalmente, se compararon las composiciones con tratamientos farmacológicos de referencia ya comercializados o en proceso de desarrollo.

5 Los experimentos se realizaron con ratones db/db. Los ratones db/db presentan una mutación de los receptores de la leptina que induce un desajuste de la señalización celular de esta última. Los receptores de la leptina se expresan altamente a nivel del hipotálamo. Los ratones que presentan una mutación de estos receptores no pueden regular eficazmente sus reservas de energía. Esto da como resultado una insulinemia elevada desde los primeros días de vida (10-14 días), y una obesidad a partir de 3 a 4 semanas con un aumento de la glucemia. Estos ratones son insulinoresistentes, presentan hipertrigliceridemia y son intolerantes a la glucosa. Constituyen un modelo pertinente y predictivo en particular para el estudio de la sensibilidad a la insulina, de la trigliceridemia, de la diabetes tipo 2 y de una de sus complicaciones, la esteatosis hepática no alcohólica (NASH) (Aileen JF King Br J Pharmacol 2012; 166(3):877-894; Sanches SC *et al.* Biomed Res Int 2015).

## 15 II.1 Ensayos A

El tiempo de experimento fue de 9 semanas con un periodo de “preinclusión” de 1 semana seguido por 8 semanas de complementación con los extractos vegetales y una composición X. Los ratones macho tenían 10 semanas de edad al principio del tratamiento.

20 Se sometieron a prueba 9 composiciones X. Estas composiciones se integraron directamente en la alimentación de los roedores, esto permite asegurarse de su eficacia “de múltiples dianas” y de su utilización a gran escala, limitándose las inyecciones intravenosas o intraperitoneales a un pequeño número de personas teniendo en cuenta su modo de administración. Esto también evita las sondas nasogástricas diarias que alteran diferentes procesos fisiológicos.

25 Las composiciones sometidas a prueba fueron las siguientes:

- 30 ▪ C1: *Chrysanthellum indicum* (planta entera) + piperina (respectivamente el 1% y el 0,1% de la alimentación);
- C2: *Cynara scolymus* (hojas) + piperina (respectivamente el 1% y el 0,1% de la alimentación);
- C3: *Vaccinium myrtillus* (frutos) + piperina (respectivamente el 1% y el 0,1% de la alimentación);
- 35 ▪ C4: *Chrysanthellum indicum* (planta entera) + *Cynara scolymus* (hojas) + *Vaccinium myrtillus* (frutos) + piperina (respectivamente el 1%, el 1%, el 1% y el 0,1% de la alimentación);
- C5: piperina (0,1% de la alimentación);
- 40 ▪ C6: *Chrysanthellum indicum* (planta entera) + *Cynara scolymus* (hojas) + *Vaccinium myrtillus* (frutos) (respectivamente el 1%, el 1% y el 1% de la alimentación);
- C7: *Chrysanthellum indicum* (planta entera) + *Cynara scolymus* (hojas) + *Vaccinium myrtillus* (frutos) + piperina (respectivamente el 1%, el 1%, el 1%, el 0,001% de la alimentación);
- 45 ▪ C8: *Olea europaea* (hojas) (0,6% de la alimentación);
- C9: *Chrysanthellum indicum* (planta entera) + *Cynara scolymus* (hojas) + *Vaccinium myrtillus* (frutos) + piperina + *Olea europaea* (hojas) (respectivamente el 1%, el 1%, el 1%, el 0,001%, el 0,6% de la alimentación).

50 Por piperina se entiende o bien piperina sintética, o bien un extracto de *Piper* normalizado al 95% de piperina. Para los demás vegetales, se trataba de extractos secos obtenidos a partir de materias primas vegetales.

55 Los experimentos se desarrollaron en varias etapas. Por lo tanto, se realizaron varios grupos de “control a voluntad”. Se combinaron los resultados procedentes de estos grupos. Las composiciones C1, C2, C3, C4, C5, C8 y C9 indujeron una disminución similar de la ingesta alimentaria. Por lo tanto se realizó un grupo de “control según alimentación”, es decir que consumía la misma cantidad diaria de alimento que los grupos C1, C2, C3, C4, C5, C8 y C9, para poder comparar los resultados con una ingesta alimentaria equivalente.

60 Las evaluaciones experimentales estuvieron relacionadas en particular con:

- La medición de la masa corporal;
- La medición de la glucemia en ayunas;
- 65 - La evolución de la glucemia durante una prueba oral de tolerancia a los glúcidos. Tras una sonda

nasogástrica con almidón (3 g/kg) en ayunas, se midió la evolución de la glucemia en respuesta al almidón en la cola mediante biopsia justo antes de la sonda nasogástrica (t0), después tras 30, 60, 90 y 120 minutos. Se calculó el área bajo la curva (AUC = "area under the curve"). Un aumento del AUC traduce una intolerancia a los glúcidos, una disminución traduce una mejora de la tolerancia a los glúcidos.

5 Para las composiciones C7 a C9, también se realizó una prueba de sensibilidad a la insulina. Esta prueba consistía en una inyección intraperitoneal de insulina (2 U/kg) en ayunas. Se midió la evolución de la glucemia en respuesta a la inyección de insulina en la cola mediante biopsia justo antes de la inyección (t0), después tras 30, 60, 90 y 120 minutos. Se calculó el área bajo la curva (AUC = "area under the curve"). Una disminución del AUC traduce una mejor respuesta a la inyección de insulina y por tanto una mejora de la sensibilidad a la insulina. Por el contrario, un aumento del AUC traduce una sensibilidad peor a la insulina y por tanto una insulinoresistencia.

15 Las evaluaciones presentadas se realizaron justo antes de la complementación (t = 0) y al final de la complementación (t = 8 semanas).

Los resultados obtenidos se presentan en tablas:

- Tabla 9 para el efecto sobre la sensibilidad a la insulina tras 8 semanas de tratamiento,
- Tabla 10 para el efecto sobre la glucemia en ayunas tras 8 semanas de tratamiento,
- Tabla 11 para el efecto sobre la tolerancia a los glúcidos tras 8 semanas de tratamiento,
- Tabla 12 para el efecto sobre la masa corporal tras 8 semanas de tratamiento.

Sensibilidad a la insulina

25 Tabla 9. Efecto de las composiciones sobre la sensibilidad a la insulina tras 8 semanas de tratamiento

Composiciones	AUC (semana 8 - semana 0, en mg x min/dl) (media ± EEM)
<i>Control a voluntad</i>	19186 ± 3460
<i>C7</i>	2082 ± 2082**
<i>C8</i>	8970 ± 2959
<i>C9</i>	-6520 ± 4685**

30 Valores medios ± EEM. Control a voluntad, n = 20; C7, n = 11; C8, n = 10; C9, n = 9. Composición frente a control, prueba de la t de Student para datos no emparejados, \*\*p < 0.01.

35 Los resultados presentados en la tabla 9 también se ilustran en la figura 1. Estos resultados muestran un efecto muy significativo e importante de las composiciones C7 y C9 sobre la sensibilidad a la insulina. La mejora de la sensibilidad a la insulina con las composiciones C7 y C9 según la invención es particularmente interesante en la prevención y en el tratamiento de la diabetes tipo 2 y de sus complicaciones. En efecto, la insulinoresistencia es uno de los mecanismos principales de progresión de la diabetes tipo 2 (Samuel VT *et al.* Cell 2012; 148:852-71). Por otro lado, al actuar sobre este parámetro, las composiciones C7 y C9 según la invención están particularmente adaptadas en las otras patologías de las que una de las causas importantes es la insulinoresistencia. En particular es el caso de una de las complicaciones de la diabetes tipo 2, la esteatosis hepática no alcohólica (NASH; Samuel VT *et al.* Cell 2012; 148:852-71), y de la enfermedad de Alzheimer (Bedse G *et al.* Front Neurosci 2015; 9:204).

Glucemia en ayunas

45 Tabla 10. Efecto de las composiciones sobre la glucemia en ayunas tras 8 semanas de tratamiento

Composiciones	Glucemia en ayunas (en mg/dl)
<i>Control a voluntad</i>	534 ± 10
<i>Control según alimentación</i>	518,2 ± 38
<i>C1</i>	410,4 ± 33*
<i>C2</i>	448 ± 34
<i>C3</i>	384 ± 40*
<i>C4</i>	335 ± 38**
<i>C5</i>	449 ± 11
<i>C6</i>	536 ± 15
<i>C7</i>	571 ± 14*
<i>C8</i>	400 ± 61
<i>C9</i>	220 ± 78**

Valores medios ± EEM. Control a voluntad, n = 32; Control según alimentación, n = 10; C1, n = 9; C2, n = 9; C3, n = 9; C4, n = 8; C5, n = 9; C6, n = 14; C7, n = 12; C8, n = 12; C9, n = 9. Composición frente a control, prueba de la t de Student para datos no emparejados, \* p < 0.05. \*\* p < 0.01.

Las composiciones C1, C2, C3, C4, C5, C8 y C9 provocaron una disminución de la ingesta alimentaria. Por lo tanto se realizó un grupo según alimentación que consumía la misma cantidad de alimento. Los resultados muestran que la restricción calórica impuesta a los animales no tuvo ningún efecto sobre la glucemia en ayunas (comparación de control a voluntad frente a control según alimentación). Las composiciones C1, C3, C4 y C9 indujeron una disminución significativa de la glucemia en ayunas, observándose el efecto más notable con las composiciones C4 (*Chrysanthellum indicum* al 1%, *Cynara scolymus* al 1%, *Vaccinium myrtillus* al 1%, piperina al 0,1%) y C9 (*Chrysanthellum indicum* al 1%, *Cynara scolymus* al 1%, *Vaccinium myrtillus* al 1%, piperina al 0,001%, *Olea europaea* al 0,6%).

La composición C6 (*Chrysanthellum indicum* al 1%, *Cynara scolymus* al 1%, *Vaccinium myrtillus* al 1%) no tuvo ningún efecto sobre la glucemia en ayunas. La adición de la piperina (0,1%), aunque ésta (C5) no inducía ninguna disminución significativa de la glucemia en ayunas, a la combinación C6 para obtener la combinación C4, permitió de manera sorprendente reducir de manera significativa y fuerte la glucemia en ayunas. Asimismo, la adición de *Olea europaea* (0,6%; C8) a la combinación C7 (*Chrysanthellum indicum* al 1%, *Cynara scolymus* al 1%, *Vaccinium myrtillus* al 1%, piperina al 0,001%) para obtener la composición C9 también permitió reducir fuertemente la glucemia a un nivel casi similar al de ratones no diabéticos.

Tolerancia a los glúcidos

Tabla 11. Efecto de las composiciones sobre la tolerancia a los glúcidos tras 8 semanas de tratamiento

Composiciones	AUC (semana 8 - semana 0, en mg x min/dl) (media ± EEM)
<i>Control a voluntad</i>	10954 ± 2000
<i>Control según alimentación</i>	20355 ± 6554
C1	3367 ± 3039*
C2	1901 ± 3949*
C3	-2418 ± 3260**
C4	-11537 ± 4168**
C5	3610 ± 2086*
C6	13068 ± 3064
C7	8639 ± 2844
C8	-8889 ± 5436**
C9	-24568 ± 10 440**

Valores medios ± EEM. Control a voluntad, n = 22; Control según alimentación, n = 10; C1, n = 9; C2, n = 8; C3, n = 10; C4, n = 8; C5, n = 9; C6, n = 14; C7, n = 12; C8, n = 10; C9, n = 9. AUC: "area under the curve" (área bajo la curva). Composición frente a control, prueba de la t de Student para datos no emparejados, \* p < 0.05. \*\* p < 0.01.

Las composiciones C1, C2, C3, C4, C5, C8 y C9 provocaron una disminución de la ingesta alimentaria. Por lo tanto se realizó un grupo según alimentación que consumía la misma cantidad de alimento. Los resultados muestran que la restricción calórica impuesta a los animales no tuvo ningún efecto sobre la tolerancia a los glúcidos (comparación de control a voluntad frente a control según alimentación). Las composiciones C1, C2, C3, C4, C5, C8 y C9 indujeron una disminución significativa del AUC, lo cual traduce una mejora de la tolerancia a los glúcidos. El efecto más notable se obtiene con las combinaciones C4 y C9.

Masa corporal

Tabla 12. Efecto de las composiciones sobre la masa corporal tras 8 semanas

Composiciones	Masa corporal (en g, media ± EEM)
<i>Control a voluntad</i>	36,9 ± 1,2
<i>Control según alimentación</i>	30,6 ± 1,2
C1	33,9 ± 2,4
C2	37,4 ± 2,2*
C3	37,0 ± 2,7*
C4	36,3 ± 1,7*
C5	32,7 ± 1,5
C6	29,3 ± 1,8***
C7	34,5 ± 1,6
C8	26,9 ± 2,0
C9	25,0 ± 2,1*

Valores medios ± EEM. Control a voluntad, n = 34; Control según alimentación, n = 10; C1, n = 9; C2, n = 9; C3, n = 9; C4, n = 8; C5, n = 9; C6, n = 14; C7, n = 12; C8, n = 10; C9, n = 9. Composición frente a control, prueba de la

t de Student para datos no emparejados, \* p < 0.05. \*\* p < 0.01. \*\*\* p < 0.0001.

Las composiciones C1, C2, C3, C4, C5, C8 y C9 provocaron una disminución de la ingesta alimentaria. Por lo tanto se realizó un grupo según alimentación que consumía la misma cantidad de alimento. Los resultados muestran que la restricción calórica impuesta a los animales indujo una disminución significativa de la masa corporal (comparación de control a voluntad frente a control según alimentación, p < 0.05). Las composiciones C2, C3, C4, C6 y C9 también indujeron una disminución significativa de la masa corporal. Aunque la combinación C6 no tuvo ningún efecto sobre la glucemia en ayunas, ésta indujo una reducción importante y significativa de la masa corporal que le confiere propiedades interesantes en la prevención y el tratamiento de la obesidad. La combinación C9 tuvo el efecto más notable.

Efecto sinérgico

Por otro lado, se evaluó el efecto sinérgico según el método de Colby SR descrito en "Calculation of the synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations" Weeds, 1967, 15:20-22. Este método se utilizó en particular en la patente EP03812880. Para cada combinación, se calculó el factor de sinergia. Un factor > 1 indica la existencia de un efecto sinérgico. Un factor < 1 indica la existencia de un antagonista. Los cálculos realizados son:

$$\text{Factor de sinergia (FS)} = \frac{\text{Tasa de eficacia esperada} + \text{Tasa de eficacia observada} - (\text{A} \cdot \text{B} / 100)}{\text{Tasa de eficacia esperada}} \times 100$$

Los cálculos se refieren a las siguientes combinaciones:

- Cálculo de FS para la combinación de *Chrysanthellum indicum* al 1%/Cynara scolymus al 1%/Vaccinium myrtillus al 1%/piperina al 0.1% (composición C4) en la que A = *Chrysanthellum indicum* al 1%/Cynara scolymus al 1%/Vaccinium myrtillus al 1% (C6) y B = piperina (C5);
- Cálculo de FS para la combinación de *Chrysanthellum indicum* al 1%/Cynara scolymus al 1%/Vaccinium myrtillus al 1%/piperina al 0.001%/Olea europaea al 0.6% (composición C9) en la que A = *Chrysanthellum indicum* al 1%/Cynara scolymus al 1%/Vaccinium myrtillus al 1%/piperina al 0.001% (composición C7) y B = *Olea europaea* al 0.6% (composición C8).

La tabla 13 a continuación facilita los resultados para la combinación C6 + C5 = C4.

Tabla 13. Factores de sinergia para la combinación C6 + C5 = C4

	Tasa de eficacia observada (en % del grupo de control)			Tasa de eficacia esperada con C4	Factor de sinergia
	C6	C5	C4		
Glucemia en ayunas tras 8 semanas de tratamiento	+2,6%	-13,3%	-35,3%	-11,0%	3,20
Prueba oral de tolerancia a los glúcidos, AUC (semana 8 - semana 0)	+9,5%	-82,3%	-156,7%	-82,3%	1,94

Los resultados presentados en la tabla 13 se ilustran en las figuras 2 y 3. Se demuestra un efecto sinérgico importante con la composición C4 según la invención, a la vez sobre la glucemia en ayunas y sobre la tolerancia a los glúcidos (AUC).

La tabla 14 a continuación facilita los resultados para la combinación C7 + C8 = C9.

Tabla 14. Factores de sinergia para la combinación C7 + C8 = C9

	Tasa de eficacia observada (en % del grupo de control)			Tasa de eficacia esperada con C9	Factor de sinergia
	C7	C8	C9		
Glucemia en ayunas tras 8 semanas de tratamiento	+5,7%	-26,1%	-59,4%	-21,9%	2,71
Prueba oral de tolerancia a los glúcidos, AUC (semana 8 - semana 0)	+4,6%	-204,5%	-388,7%	-209,3%	1,86
Prueba oral de sensibilidad a la insulina, AUC (semana 8 - semana 0)	-89,1%	-53,2%	-129,3%	-94,9%	1,36

Los resultados presentados en la tabla 14 se ilustran en las figuras 4, 5 y 6. Se demuestra un efecto sinérgico importante con la composición C9 según la invención, a la vez sobre la glucemia en ayunas, sobre la tolerancia a los glúcidos (AUC) y la sensibilidad a la insulina (AUC). Y esto aunque la composición C7 ya tenía un efecto significativo e importante sobre la mejora de la sensibilidad a la insulina.

II.2 Ensayos B

5 Se preparó otra composición, C10, y se sometió a prueba *in vivo*: *Chrysanthellum indicum* (parte aérea, extracto seco) + *Cynara scolymus* (hojas, extracto seco) + *Vaccinium myrtillus* (frutos, extracto seco) + *Piper nigrum* (frutos, extracto seco) + *Olea europaea* (hojas, extracto seco).

10 Más precisamente, se sometió a prueba la composición C10 *in vivo* en comparación con la metformina, la molécula terapéutica de referencia en el tratamiento de la diabetes tipo 2, en el mismo modelo los ensayos A (ratón db/db). Utilizando este modelo de ratón diabético predictivo e integrando la composición C10 directamente en la alimentación de los roedores (*Chrysanthellum indicum* al 1%, *Cynara scolymus* al 1%, *Vaccinium myrtillus* al 0,1%, *Piper nigrum* al 0,001% y *Olea europaea* al 0,6% de la alimentación), esto permite asegurarse de su eficacia “de múltiples dianas” y de su utilización a gran escala, limitándose las inyecciones intravenosas o intraperitoneales a un pequeño número de personas teniendo en cuenta su modo de administración.

15 El tiempo de experimento fue de 7 semanas con un periodo de “preinclusión” de 1 semana seguido por 6 semanas de complementación con la composición C10. Los ratones macho tenían 6 semanas de edad al principio del tratamiento. Las evaluaciones se realizaron justo antes de la complementación (t = 0), de manera semanal para determinados parámetros, y al final de la complementación (t = 6 semanas).

20 Las evaluaciones experimentales estuvieron relacionadas en particular con:

- La medición de la ingesta alimentaria (t1, t2, t3, t4 y t5 semanas);
- 25 - La medición de la masa corporal (t0, t1, t2, t3, t4, t5, t6 semanas);
- La medición de la masa grasa y magra mediante IRM (obtención de imágenes por resonancia magnética; t0 y t6 semanas);
- 30 - La medición de la glucemia en ayunas (t0, t1, t2, t3, t4, t5, t6 semanas);
- La medición de la hemoglobina glicosilada (HbA1c; t6 semanas);
- La sensibilidad a la insulina (prueba idéntica a la realizada en los ensayos A; t0 y t6 semanas);
- 35 - La tolerancia a los glúcidos (prueba idéntica a la realizada en los ensayos A; t0 y t6 semanas);
- La medición de los triglicéridos en suero y hepáticos (t6 semanas);
- 40 - La medición del colesterol-HDL en suero (t6 semanas).

El conjunto de estas evaluaciones lo conoce perfectamente el experto en la materia.

45 Los resultados se presentan en la tabla 15 a continuación. Es importante considerar que la cantidad de metformina ingerida diariamente por los ratones era superior en aproximadamente el 26% a la cantidad de moléculas totales presentes en la composición C10 según la invención. Dicho de otro modo, la dosis de metformina administrada era más importante que la dosis de moléculas totales presentes en la composición C10.

Parámetros	Control	Metformina	C10
Ingesta alimentaria (g/día)	9.6 ± 0.5	10.0 ± 0.6	10.7 ± 0.8
Masa corporal (g)	44.7 ± 2.0	40.8 ± 2.1	36.3 ± 1.7 <sup>a</sup>
Masa grasa (%)	26.1 ± 1.5	23.2 ± 1.7	19.1 ± 1.1 <sup>a</sup>
Masa magra (%)	17.0 ± 0.5	16.5 ± 0.5	16.5 ± 0.6
Glucemia en ayunas (mg/dl)	437 ± 26	474 ± 24	160 ± 20 <sup>a,b</sup>
HbA1c (%)	8.33 ± 0.53	7.59 ± 0.24	4.25 ± 0.20 <sup>a,b</sup>
Área bajo la curva medida durante una prueba oral de sensibilidad a la insulina (AUC, mg.min/dl)	50940 ± 2968	32778 ± 3166	14109 ± 1856 <sup>a,b</sup>
Área bajo la curva medida durante una prueba oral de tolerancia a los glúcidos (AUC, mg.min/dl)	61050 ± 2757	65614 ± 1577	28823 ± 5333 <sup>a,b</sup>
Triglicéridos en suero (mg/dl)	231.23 ± 18.29	256.23 ± 28.19	177.80 ± 19.60 <sup>b</sup>
Triglicéridos hepáticos (µmol/mg de tejido)	41.10 ± 1.80	38.39 ± 4.84	21.39 ± 2.21 <sup>a,b</sup>
Colesterol-HDL (mg/dl)	74.34 ± 4.10	99.21 ± 6.03	111.72 ± 8.39 <sup>a</sup>

50 Valores medios ± EEM. Control, n = 10; metformina, n = 11; C10, n = 10. Prueba de la t de Student para datos no emparejados. <sup>a</sup>: C10 frente a control, p < 0.05. <sup>b</sup>: C10 frente a metformina, p < 0.05.

La figura 7 ilustra más particularmente los efectos de la metformina y de la composición C12 según la invención sobre la sensibilidad a la insulina.

5 Los resultados ilustrados en la tabla 15 muestran un efecto extremadamente importante y sorprendente de la composición C10 según la invención sobre un conjunto de factores de riesgo del síndrome metabólico, del sobrepeso, de la obesidad, de la diabetes, de la esteatosis hepática no alcohólica (NASH), y de las enfermedades cardiovasculares, a saber:

- 10       ▪ La disminución del peso corporal mediante una reducción de la masa grasa, sin afectar a la masa magra;
- Una disminución de la glucemia en ayunas y de la hemoglobina glicosilada;
- Una mejora de la tolerancia a los glúcidos;
- Una mejora de la sensibilidad a la insulina;
- 15       ▪ Una disminución de los triglicéridos hepáticos y en suero;
- Un aumento del colesterol-HDL ("colesterol bueno").

No solamente la composición según la invención disminuye todo un conjunto de factores de riesgo, sino que sobre todo los mejora a un nivel casi equivalente a ratones no diabéticos (ratones sanos). Dicho de otro modo, la invención impide la instalación y la progresión de la diabetes tipo 2.

20 Las figuras 8 y 9 ilustran los efectos de la composición C10 según la invención sobre la evolución de la masa corporal y de la glucemia en ayunas en comparación con el grupo de control. La composición C10 según la invención limita de manera importante el aumento de masa e impide el aumento de la glucemia.

25 Además, sus efectos son muy superiores a los de la metformina, el principal medicamento antidiabético (Ferrannini E *et al.* Eur Heart J; 10 de junio de 2015; ejemplo: GLUCOPHAGE®) y demuestra la ausencia de efectos secundarios sobre los lípidos en circulación, a diferencia del OCA (ácido obeticoólico, un agonista de FXR destinado al tratamiento de la diabetes tipo 2 y de la NASH (esteatosis hepática no alcohólica)) desarrollado por la sociedad INTERCEPT que disminuye de manera drástica el colesterol-HDL (-0.2 g/l,  $p < 0.01$ ) en circulación ("colesterol bueno"). Por el contrario, la composición según la invención aumenta el 50.3% la tasa de colesterol-HDL en circulación.

35 Por otro lado, el efecto de la composición según la invención es superior al del candidato a medicamento desarrollado por la sociedad GENFIT, el GFT 505 (ela fibrador), sobre la hemoglobina glicosilada (HbA1c), el principal indicador diagnóstico de la diabetes tipo 2 y de sus complicaciones mórbidas: composición C10, HbA1c = 4% frente a GFT 505, HbA1c = 6% para la dosis más alta (mismo modelo de ratón db/db y diseño experimental similar; Hanf R *et al.* Diab Vasc Dis Res 2014; 11:440-7). Una reducción del 1% adicional de la HbA1c disminuye los riesgos de infarto en un 14%, de enfermedades cardiovasculares en un 37% y de amputaciones en un 43%. Además, la composición según la invención retarda, incluso detiene, la degeneración de las células beta del páncreas, células responsables de la secreción de insulina en respuesta a un aumento de la glucemia. En efecto, la diabetes tipo 2 induce progresivamente una degradación de las células beta del páncreas asociadas en parte a la hiperglucemia crónica. Esto se traduce en un aumento de la secreción de insulina en los primeros estadios de la enfermedad para disminuir la glucemia (aumento de la insulinemia), después en una disminución progresiva de su secreción (insulinemia en circulación más baja), debido a la destrucción progresiva de las células beta (Leahy JL *et al.* J Clin Invest 1985; 77: 908-915). Los resultados obtenidos respaldan fuertemente un efecto de la composición C10 sobre las células beta del páncreas. En efecto, después de seis semanas de complementación, la insulinemia es más alta en el grupo que recibe composición C10 según la invención frente al control ( $27.40 \pm 4.11$  frente a  $9.64 \pm 2.53$  ng/ml,  $p < 0.01$ , respectivamente), lo que traduce un estadio de avance de la diabetes muy diferente: diabetes avanzada en el grupo de control con destrucción de las células beta (insulinemia baja, glucemia en ayunas alta, HbA1c alta) y diabetes poco avanzada, incluso ausencia de diabetes en el grupo de la composición C10 según la invención con células beta funcionales (insulinemia alta, glucemia baja, HbA1c baja).

40 Por tanto, la invención responde perfectamente a la necesidad de soluciones de prevención y de soluciones terapéuticas nuevas que tengan en cuenta el carácter de múltiples factores de los trastornos cardiometabólicos. Esta invención representa un avance principal para frenar considerablemente el desarrollo de las enfermedades metabólicas y su carácter mórbido.

45 También se realizaron mediciones de biología molecular a nivel hepático. Estas evaluaciones se llevaron a cabo después de las seis semanas de tratamiento y después del sacrificio de los animales. En particular, se determinaron las cantidades de proteínas AMPK (proteína cinasa activada por AMP) hepáticas mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se considera que la AMPK es un sensor metabólico. Como enzima ubicua, la AMPK participa en la regulación coordinada del metabolismo energético, de la ingesta alimentaria y de la sensibilidad de los tejidos en respuesta a numerosas señales metabólicas y hormonales. Estas propiedades le confieren por tanto un papel de diana farmacológica principal con objetivo metabólico (diabetes, insulinorresistencia, obesidad) y cardiológico (isquemia cardíaca, complicaciones asociadas a la diabetes) (Coughlan KA *et al.* Diabetes Metab Syndr Obes 2014; 7: 241-53). Aumentar las cantidades de AMPK constituye una estrategia de primer interés en la identificación

y la validación de tratamientos de la diabetes tipo 2 y de sus complicaciones (en particular esteatosis hepática no alcohólica), y de manera más global para las patologías asociadas a trastornos metabólicos.

5 Los resultados muestran a nivel hepático que la composición C10 según la invención induce un aumento neto de la cantidad de AMPK (control n = 9,  $1,00 \pm 0,22$  frente a C10 n = 9,  $1,96 \pm 0,73$ ,  $p < 0,001$ , prueba de la U de Mann Whitney). Los resultados se ilustran mediante la inmunotransferencia de tipo Western de la figura 10.

El protocolo experimental que puede realizar cualquier experto en la materia se indica en las siguientes líneas.

10 → AMPK

#### Extracción de las proteínas

15 Se colocaron 50 mg de tejido congelado (hígado) en 20 volúmenes de tampón NP-40 (Tris HCl 50 mM, pH: 7.4. NaCl 150 mM, NaF 1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, Nonidet P-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,25%) en presencia de 1  $\mu\text{l}$  de cóctel de inhibidores de proteasas (P8340, Sigma Aldrich) y de comprimidos inhibidores de fosfatasa (#88667 Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Se homogeneizaron los tejidos en hielo por medio de un recipiente de vidrio y después se centrifugaron a 14000 g durante 10 minutos a 4°C antes de recuperar el sobrenadante. Se valoró el contenido en proteínas del sobrenadante mediante el kit Bio-Rad DC (Bio-Rad, EE.UU.) y después se llevaron todas las muestras a la misma concentración convencional antes de diluirse una segunda vez en tampón Laemmli 2X y después se calentaron a 90°C durante 3 minutos.

#### Inmunotransferencia

25 Para cada prueba, se depositaron un marcador de peso molecular y un control interno al lado de 15  $\mu\text{g}$  de cada muestra sobre un gel en gradiente de poliacrilamida (el 4-15% de Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Gel, BioRad, EE.UU.). A continuación se sometieron los geles a una corriente de 300 V durante de 18 a 20 minutos en un tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1%) antes de transferir las proteínas sobre una membrana de PVDF gracias a un sistema de transferencia semilíquido (Transblot, Bio-Rad, EE.UU.) mediante una corriente continua de 25 V y 2,5 A durante 7 minutos. Después se incubaron las membranas en un tampón Tween - Tris solución salina (TTBS: base Tris 50 mM pH: 7,5. NaCl 150 mM, y Tween 20 al 0,01%) enriquecido con el 5% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se aclararon las membranas con TTBS y después se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos anti-AMPK $\alpha$  (D63G4, Cell Signaling, EE.UU.). Tras la incubación, se lavaron de nuevo las membranas con TTBS y después se expusieron a un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa del rábano, a una concentración de 1:3000 durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las membranas 3 veces en TTBS antes de exponerse a una disolución de quimioluminiscencia (Clarity Western ECL; Bio-Rad, EE.UU.) durante 1 minuto. Después se exploraron las membranas en un sistema Bio-Rad Chemidoc y se midió la intensidad de las bandas con la ayuda del software de análisis de imágenes proporcionado (ImageLab V4.1, Bio-Rad, EE.UU.).

40

#### II.3 Ensayo C

45 Uno de los principales inconvenientes de numerosas moléculas terapéuticas actualmente en el mercado es su efecto hipoglucemiante tras una sola dosis, con un riesgo elevado de hipoglucemia. Para someter a prueba el efecto hipoglucemiante tras una sola dosis de la composición C10 según la invención, se administró la composición mediante sonda nasogástrica (400 mg/kg) a seis ratones sanos C57BL/6N. Se midió la glucemia mediante biopsia a nivel de la cola antes y después de la sonda nasogástrica (t0, t15 minutos, t30 minutos). Por otro lado, según un protocolo cruzado, los mismos ratones recibieron mediante sonda nasogástrica una solución salina con mediciones de la glucemia (t0, t15 minutos, t30 minutos). Los resultados ilustrados en la figura 11 demuestran la ausencia de efecto hipoglucemiante tras una sola dosis de la composición C10 según la invención.

50

#### II.4 Ensayo D

55 Una composición C11 de un extracto único (extracto seco hidro-alcohólico) obtenido a partir de polvo de partes aéreas de *Chrysanthellum indicum*, de hojas de *Cynara scolymus*, de frutos de *Vaccinium myrtillus*, de frutos de *Piper nigrum* y de hojas de *Olea europaea* (relación 1/1/0,1/0,0001/0,6) se sometió a prueba en el mismo modelo de ratones diabéticos utilizado en los ensayos A y B.

60 El tiempo del experimento era de 6 semanas con un "Run-in" de 1 semana seguido de 5 semanas de complementación con la composición C11. Los ratones machos tenían 6 semanas de edad al inicio del tratamiento. La evaluación se centró principalmente en la evolución de la masa corporal. Las mediciones se realizaron justo antes de la complementación (t = 0), semanalmente para ciertos parámetros, y al final de la complementación (t = 5 semanas). La composición se integró en la alimentación de los roedores a razón de 2,7% de los alimentos (igual cantidad que la composición C10).

65

La figura 12 ilustra los efectos de la composición C11 según la invención en la evolución de la masa corporal en



comparación con el grupo de control. La composición C11 según la invención limita en gran medida la ganancia de masa corporal.

### 5 III. Evaluación *in vitro* de la eficacia de la composición

También se llevaron a cabo experimentos *in vitro* para demostrar los efectos de las composiciones C10 y C11 según la invención. También se sometió a prueba la composición C12 de asociación de moléculas según la invención: ácido dicafeoilquinico + 7-O-glucuronido de apigenina + ácido monocafooilquinico + oleuropeína + piperina (razón de 1/1/1/1/0.001).

10 Se llevaron a cabo diferentes pruebas de actividad enzimática con el fin de determinar si las composiciones según la invención inhibían enzimas estratégicas del metabolismo de los glúcidos y de los lípidos: la alfa-glucosidasa, DDP-IV y la HMGCoA reductasa. Una acción sobre el conjunto de estas dianas estratégicas permite ocuparse de manera global de la diabetes tipo 2 y de sus complicaciones (pie diabético, retinopatía, pérdida de la visión, nefropatía, acontecimientos cardiovasculares, esteatosis hepática no alcohólica o NASH).

#### 15 → HMG-CoA reductasa

20 Para el control de los lípidos en circulación, el objetivo es reducir la concentración de colesterol en suero dirigiéndose como diana principalmente a la inhibición de la biosíntesis del colesterol (inhibición de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A o HMG-CoA reductasa). La pravastatina es una de las moléculas de referencia para la disminución del colesterol-LDL y del colesterol total. Se comercializa en particular con el nombre de ELISOR<sup>®</sup>, PRAVASTATINE MYLAN, VASTEN<sup>®</sup>, PRAVASTATINE TEVA.

#### 25 → Alfa-glucosidasa

30 La alfa-glucosidasa es una enzima que cataliza la etapa final del proceso de digestión de los hidratos de carbono. Los inhibidores de la alfa-glucosidasa (ejemplos de medicamentos que se encuentran dentro de esta categoría: GLUCOR<sup>®</sup>, DIASTABOL<sup>®</sup>) se utilizan para disminuir la glucemia posprandial, considerada como un factor de riesgo independiente de las complicaciones macrovasculares en la diabetes (Kim JS *et al.* Biosci Biotechnol Biochem 2000; 64: 2458-61).

#### 35 → DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV)

40 Los inhibidores de DPP-IV se consideran como una de las estrategias para encargarse de la diabetes tipo 2 más prometedoras (von Geldern TW *et al.* Drug Development Research 2006; 67: 627-42). DPP-IV inactiva rápidamente las hormonas GLP-1 (péptido similar a glucagón 1) y GIP (polipéptido insulínico dependiente de la glucosa), también conocidas con el nombre de incretinas. La inhibición de DPP-IV permite aumentar en particular la acción de GLP-1 y de GIP permitiendo así una estimulación fisiológica de la secreción de insulina y una inhibición de la secreción de glucagón por el páncreas, y como consecuencia una disminución de la glucemia. Por otro lado, la inhibición de DPP-IV favorece el vaciado gástrico y provoca un efecto anorexígeno central. Por tanto, la inhibición de DPP-IV permite una mejor regulación de los glúcidos en las personas diabéticas. Los estudios clínicos muestran por otro lado que los inhibidores de DPP-IV presentan una buena eficacia con una buena tolerancia al encargarse de la hiperglucemia en las personas que padecen diabetes tipo 2, sin aumento de peso ni fenómenos de hipoglucemia (Green BD *et al.* Diabetes Vasc Dis Res 2006; 3: 159-65). Uno de los inhibidores de referencia es la diprotina A.

El protocolo experimental para evaluar el potencial inhibidor de las composiciones C10, C11 y C12 fu el siguiente:

#### 50 Preparación de los extractos, mezclas de extractos y mezcla de moléculas puras sintéticas

Para las pruebas de inhibición de la HMG-CoA reductasa y de las glucosidasas, se diluyeron los extractos vegetales en mezclas de agua ultrapura/etanol, cuyas proporciones variaron según el tipo de extracto, con el fin de obtener disoluciones homogéneas.

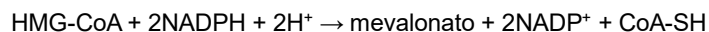
55 Tras la homogeneización, se centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes (centrifugadora 1-15 Fisher Bioblock Scientif, Sigma Aldrich<sup>®</sup>). Se diluyeron las moléculas o bien en agua ultrapura/DMSO 90/10 (v/v) o bien en agua ultrapura/etanol 50/50 (v/v).

60 Se diluyeron las mezclas de varios extractos vegetales en agua/etanol 50/50 (v/v), después se sometieron a ultrasonidos durante 15 minutos, con el fin de homogeneizar el medio (utilización de una sonda de ultrasonidos UP50H Hielscher<sup>®</sup> a potencia máxima). Finalmente, se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes (centrifugadora 1-15 Fisher Bioblock Scientif, Sigma Aldrich<sup>®</sup>).

65 En el caso de la prueba DPP-IV, se diluyeron las muestras o bien en tampón Trisma-HCl (pH 8.0; 100 mM), o bien en agua ultrapura/DMSO 90/10 (v/v).

Prueba de inhibición de la HMG-CoA reductasa

5 Esta prueba permite medir, mediante una disminución de la absorbancia a lo largo del tiempo, a  $\lambda=340$  nm, la eficacia de la inhibición de la actividad enzimática. El mecanismo de reacción es el siguiente:



10 Por tanto, se realiza un seguimiento de la desaparición del sustrato NADPH (que absorbe a 340 nm) a lo largo del tiempo. Una disminución de la variación de la absorbancia a 340 nm a lo largo del tiempo con respecto a la reacción de control sin inhibidor (100% de actividad) demuestra una inhibición de la enzima. En un primer momento, hace falta preparar las disoluciones a partir del kit de Sigma®:

- 15 - el tampón 5X proporcionado debe diluirse a una concentración de 1X en agua ultrapura;
- el NADPH se solubiliza mediante la adición de tampón 1X, después se distribuye en tubos de 100  $\mu\text{l}$ ;
- la disolución de partida de enzima se distribuye en alícuotas de 25  $\mu\text{l}$ .

20 Se conservaron el tampón y el NADPH a  $-20^\circ\text{C}$  y se almacenaron las alícuotas de enzimas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

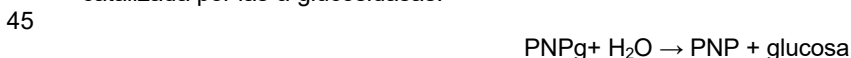
Las manipulaciones se realizaron directamente en una microplaca de 96 pocillos (NUNC96 o SARSTEDT96). Se añadieron los tampones, sustratos, inhibidores y la enzima en un orden específico (véase a continuación). Para cada microplaca fue necesario preparar un blanco, un control y se llevaron a cabo diferentes ensayos. Cada elemento se realizó por duplicado (incluso por triplicado):

- 25 - realización del blanco: 24  $\mu\text{l}$  del disolvente utilizado para las muestras, 12  $\mu\text{l}$  de HMG-CoA, 158  $\mu\text{l}$  de tampón 1X, 4  $\mu\text{l}$  de NADPH; incubación a  $37^\circ\text{C}$ , de 3 a 5 min;
- 30 - realización del control negativo: 24  $\mu\text{l}$  del disolvente utilizado para las muestras, 12  $\mu\text{l}$  de HMG-CoA, 158  $\mu\text{l}$  de tampón 1X, 4  $\mu\text{l}$  de NADPH; incubación a  $37^\circ\text{C}$ , de 3 a 5 min; adición de 2  $\mu\text{l}$  de enzima;
- realización del ensayo: 24  $\mu\text{l}$  de la muestra posiblemente inhibidora, 12  $\mu\text{l}$  de HMG-CoA, 158  $\mu\text{l}$  de tampón 1X, 4  $\mu\text{l}$  de NADPH; incubación a  $37^\circ\text{C}$ , de 3 a 5 min; adición de 2  $\mu\text{l}$  de enzima.

35 Tras la preparación de la placa, se llevó a cabo el seguimiento cinético en un lector de microplacas (BMG Labtech) a lo largo de 16 minutos, 25 segundos, con valores tomados cada 25 segundos a  $\lambda=340$  nm, es decir, un total de 40 ciclos. A partir de esto pudieron calcularse los porcentajes de inhibición.

Prueba de inhibición de las  $\alpha$ -glucosidasas

40 Las pruebas de inhibición de las  $\alpha$ -glucosidasas se llevaron a cabo realizando un seguimiento mediante espectrofotometría, a  $\lambda=405$  nm, de la formación del producto para-nitrofenol (PNP) de color amarillo a partir del sustrato sintético: el para-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (PNPg), según la siguiente reacción de hidrólisis, catalizada por las  $\alpha$ -glucosidasas:



50 Una disminución de la variación de la absorbancia, a  $\lambda=405$  nm, a lo largo del tiempo con respecto a la reacción de control sin inhibidor (100% de actividad) demuestra una inhibición de la enzima.

Se diluyó la enzima humana recombinante producida en *Saccharomyces cerevisiae* (maltase) (Sigma Aldrich®, G0660) en tampón fosfato (0,1 M, pH 6,8) para pasar de una disolución madre teóricamente a 120 U/ml, a una disolución con una actividad de 1,6 U/ml, utilizada para las pruebas.

55 Durante las pruebas de inhibición de las  $\alpha$ -glucosidasas, se llevaron a cabo las manipulaciones directamente en microplaca 96 pocillos (NUNC96 o SARSTEDT96). Se añadieron los tampones, sustratos, inhibidores y la enzima en un orden específico (véase a continuación). Para cada microplaca preparada, se realizaron un blanco, un control y diferentes ensayos. Cada elemento se realizó por duplicado (incluso por triplicado):

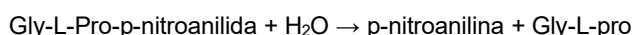
- 60 - realización del blanco: 100  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato (0,1 M, pH 6,8), 20  $\mu\text{l}$  del disolvente utilizado para las muestras, incubación a  $37^\circ\text{C}$ , de 10 a 15 min, después adición de 20  $\mu\text{l}$  de PNPg a 2,5 mM (solubilizado en tampón fosfato);
- 65 - realización del control negativo: 100  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato (0,1 M, pH 6,8), 20  $\mu\text{l}$  del disolvente utilizado para las muestras, 20  $\mu\text{l}$  de enzimas a 1,6 U/ml, incubación a  $37^\circ\text{C}$ , de 10 a 15 min, después adición de 20  $\mu\text{l}$  de PNPg a 2,5 mM (solubilizado en tampón fosfato);

- realización de la ensayo: 100 µl de tampón fosfato (0,1 M, pH 6,8), 20 µl de la muestra posiblemente inhibidora, 20 µl de enzima a 1,6 U/ml, incubación a 37°C, de 10 a 15 min, después adición de 20 µl de PNPg a 2,5 mM (solubilizado en tampón fosfato).

Tras la preparación de la placa, se llevó a cabo el seguimiento cinético en un lector de microplacas (BMG Labtech) a lo largo de 30 minutos, con valores tomados cada 2 minutos a  $\lambda=405$  nm, es decir, un total de 16 ciclos. A partir de esto pudieron calcularse los porcentajes de inhibición.

#### Prueba de inhibición de la DPP-IV

Las pruebas de inhibición de la DPP-IV se llevaron a cabo realizando un seguimiento mediante espectrofotometría, a 385 nm, de la formación del producto p-nitroanilina a partir del sustrato sintético: la Gly-L-Pro-p-nitroanilida, según la siguiente reacción de hidrólisis catalizada por la DPP-IV:



Una disminución de la variación de la absorbancia a 385 nm a lo largo del tiempo con respecto a la reacción de control sin inhibidor (100% de actividad) demuestra una inhibición de la enzima. La enzima utilizada estaba a una concentración de 0.045 U/ml (con  $U = \mu\text{mol}/\text{min}$ ), por tanto hizo falta diluirla. Dado que la dilución era grande, fue necesario realizar dos diluciones sucesivas.

Primera dilución (obtención de una disolución a  $5 \cdot 10^{-4}$  U/ml):

$$D1 = \frac{5 \cdot 10^{-4} \cdot 450}{0,045} = 5 \mu L$$

(Vfinal: 450 µl; V(Disolución madre de enzima)= 5 µl)

Segunda dilución (obtención de una disolución a  $5 \cdot 10^{-6}$  U/ml)

$$D2 = \frac{5 \cdot 10^{-6} \cdot 1000}{5 \cdot 10^{-4}} = 10 \mu L$$

(Vfinal: 1000 µl; V(D1)=10 µl) → la disolución D2 era la disolución que podía utilizarse.

Las manipulaciones se realizaron directamente en una microplaca 96 pocillos (NUNC96 o SARSTEDT96). Se añadieron los tampones, sustratos, inhibidores y la enzima en un orden específico (véase a continuación). Para cada microplaca preparada, se realizaron un blanco, un control y diferentes ensayos. Cada elemento se realizó por duplicado (incluso por triplicado):

- realización del blanco: 25 µl de la muestra, 25 µl de sustrato (Gly-L-pro-p-nitroanilida solubilizada en tampón Tris- HCl (100 mM, pH 8,0) a una concentración de 1,6 mM);
- realización del control negativo: 25 µl del diluyente utilizado para la muestra, 25 µl de sustrato, incubación a 37°C, 10 min, 50 µl de enzima a  $5 \cdot 10^{-6}$  U/ml (preparada en tampón TrisHCl 100 mM, pH 8,0);
- realización de la ensayo: 25 µl de muestra posiblemente inhibidora 25 µl de sustrato, incubación a 37°C, 10 min, 50 µl de enzima a  $5 \cdot 10^{-6}$  U/ml;

Tras la preparación de la placa, se llevó a cabo el seguimiento cinético en un lector de microplacas (BMG Labtech) a lo largo de 30 minutos, con valores tomados cada minuto a  $\lambda=385$  nm, es decir, un total de 31 ciclos. A partir de esto pudieron calcularse los porcentajes de inhibición.

#### Cálculos de los porcentajes de inhibición

De manera general, independientemente de la prueba, para una concentración dada de un inhibidor, se realizó una curva de ecuación: absorbancia=f(tiempo) (en minutos). Asimismo, se realizaron sistemáticamente controles (sin inhibidor) y blancos (sin enzimas). A nivel de las diferentes curvas obtenidas, sólo se retuvieron las partes lineales al comienzo de la cinética, ya que correspondían a las condiciones que permiten determinar las velocidades iniciales. De este modo, la pendiente en absorbancia/minuto era proporcional a la velocidad de aparición del producto (glucosidasa y DPP-IV) o de desaparición del sustrato (HMG-CoA reductasa, pendiente negativa).

Según los tipos de pruebas, los porcentajes de inhibición de las diferentes enzimas se calcularon mediante diferentes métodos:

- para las pruebas de inhibición de la HMG-CoA reductasa y de las α-glucosidasas la fórmula de cálculo es idéntica:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{pendiente de control} - \text{pendiente de muestra}}{\text{pendiente de control}} * 100$$

5

- para la prueba de inhibición de DPP4, la fórmula es ligeramente diferente ya que se tienen en cuenta blancos:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{pendiente de control} - \text{pendiente de blanco}) - (\text{pendiente de muestra} - \text{pendiente de blanco})}{(\text{pendiente de control} - \text{pendiente de blanco})} * 100$$

10 Al final, se calculó un valor medio de porcentaje de inhibición para cada concentración de inhibidor, así como la desviación estándar de cada valor. Si los valores de desviación estándar eran superiores al 10%, se realizaron nuevas pruebas por duplicado, hasta obtener valores inferiores al 10%.

15 Los resultados obtenidos con las tres enzimas para las composiciones C10 y C11 según la invención se resumen en la tabla 16 a continuación.

Producto	CI <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/ml en pocillo)	% de inhibición	
	Alfa-glucosidasa ( <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> recombinante humana)	DPP-IV <sup>b</sup> (DPP-IV recombinante humana expresada en células SF9)	HMG-CoA reductasa <sup>c</sup> (dominio catalítico de la proteína de fusión de enzima humana - GST recombinante expresada en <i>E. Coli</i> )
Acarbosa	86,3	Ausencia de inhibición	Ausencia de inhibición
Diprotina A	Ausencia de inhibición	100%	Ausencia de inhibición
Pravastatina	Ausencia de inhibición	Ausencia de inhibición	100%
Composición C10	4,3	15,3%	48,5%
Composición C11	4,9	29,3%	32,5%

<sup>a</sup>CI<sub>50</sub>: concentración de inhibidor para la que la enzima sólo tiene el 50% de su actividad. <sup>b</sup> Concentración de muestra fijada a 1,25 mg/ml. <sup>c</sup> Concentración de muestra fijada a 60 µg/ml.

Los resultados obtenidos con las tres enzimas para la asociación de moléculas (composición C12 según la invención) se resumen en la tabla 17 a continuación.

20

Producto	CI <sub>50</sub> <sup>a</sup> (ng/ml en pocillo)	% de inhibición	
	Alfa-glucosidasa ( <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> recombinante humana)	DPP-IV <sup>b</sup> (DPP-IV recombinante humana expresada en células SF9)	HMG-CoA reductasa <sup>c</sup> (dominio catalítico de la proteína de fusión de enzima humana - GST recombinante expresada en <i>E. Coli</i> )
Acarbosa	86.3	Ausencia de inhibición	Ausencia de inhibición
Diprotina A	Ausencia de inhibición	89.3%	Ausencia de inhibición
Pravastatina	Ausencia de inhibición	Ausencia de inhibición	100%
Composición C12	19.7	10.3%	30.1%

<sup>a</sup>CI<sub>50</sub>: concentración de inhibidor para la que la enzima sólo tiene el 50% de su actividad. <sup>b</sup> Concentración de muestra fijada a 250 µg/ml. <sup>c</sup> Concentración de muestra fijada a 60 µg/ml.

Se constata que, a diferencia de las moléculas inhibitoras de referencia de cada enzima [acarbosa (medicamento), diprotina A (inhibidor de referencia), pravastatina (medicamento), respectivamente], las composiciones C10, C11 y C12 según la invención son sorprendentemente las únicas que inhiben las 3 enzimas.

25

Actuando de manera simultánea sobre diversos procesos de regulación, las composiciones según la invención representan un medio de prevención y un medio terapéutico ventajosos para prevenir y tratar la diabetes, las dislipidemias y sus complicaciones. Las estrategias terapéuticas actuales consisten en asociar varios medicamentos con el fin de reducir los diferentes factores de riesgo de manera individual. No obstante, la combinación de fármacos puede generar algunas veces reacciones secundarias graves tales como, por ejemplo, la administración simultánea de fibratos y de estatinas que aumenta el riesgo de miopatía (Denke MA J Manag Care Pharm 2003; 9:17-9). Por tanto, en la actualidad existe una necesidad real de soluciones de prevención y de medicamentos cuyo mecanismo de acción "de múltiples dianas" presente ventajas en cuanto al cumplimiento, la tolerancia y la eficacia. Así, las composiciones según la invención permiten disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y prevenir y tratar cada disfunción y/o sus consecuencias tomadas de manera independiente.

30

35

**REIVINDICACIONES**

1. Composición que comprende por lo menos una mezcla de moléculas constituida por lo menos:

- 5 - por un extracto único obtenido a partir de *Chrysanthellum indicum*, *Cynara scolymus*, y *Vaccinium myrtillus*, de *Olea europaea* y Piper, y/o
- por un extracto único obtenido a partir de por lo menos *Chrysanthellum indicum*, *Cynara scolymus*, y *Vaccinium myrtillus* y de *Olea europaea* y por piperina sintética,

10

comprendiendo dicha mezcla de moléculas:

- 15 - por lo menos una molécula seleccionada de entre apigenina-7-O-glucurónido, la crisantelina A, la crisantelina B, el ácido cafeico, la luteolina, la maritimetina, el eriodictiol, la isookanina, la apigenina, luteolina-7-O-glucósido, la marimeína, la mareína, eriodictiol-7-O-glucósido, la flavomareína, apigenina-8-C- $\alpha$ -L-arabinósido-6-C- $\beta$ -D-glucósido (shaftósido), apigenina-6,8-C-di- $\beta$ -D-glucopiranósido (vicenina-2), y
- 20 - por lo menos una molécula seleccionada de entre un ácido dicafeoilquínico, un ácido sulfomonocafeoilquínico, la luteolina, luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucurónido, apigenina-7-O-glucósido, la cinaropicrina, y
- por lo menos una molécula seleccionada de entre un ácido monocafeoilquínico, delfinidina-3-galactósido, delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, delfinidina-3-arabinósido, cianidina-3-glucósido, petunidina-3-galactósido, cianidina-3-arabinósido, petunidina-3-glucósido, peonidina-3-galactósido, petunidina-3-arabinósido, peonidina-3-glucósido, malvidina-3-galactósido, malvidina-3-glucósido, malvidina-3-arabinósido, y
- 25 - por lo menos una molécula seleccionada de entre la oleuropeína y el hidroxitirosol, y
- 30 - por lo menos piperina.

30

2. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que *Piper* se selecciona de entre *Piper nigrum*, *Piper aduncum* y/o *Piper longum*.

35 3. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que el o los extracto(s) único(s) se obtiene(n) a partir de:

- 40 - planta entera y/o de las partes aéreas de *Chrysanthellum indicum*.
- planta entera y/o de hojas de *Cynara scolymus*.
- planta entera y/o de frutos de *Vaccinium myrtillus*.

40

4. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que presenta por lo menos una de las características siguientes:

- 45 - comprende una cantidad de extracto de *Chrysanthellum indicum* que permite la administración de por lo menos 0,00001 g de extracto de *Chrysanthellum indicum* por kg de peso corporal de la persona a la que se administra la composición y por día, y/o
- 50 - comprende una cantidad de extracto de *Cynara scolymus* que permite la administración de por lo menos 0,00001 g de extracto de *Cynara scolymus* por kg de peso corporal de la persona a la que se administra la composición y por día, y/o
- comprende una cantidad de extracto de *Vaccinium myrtillus* que permite la administración de por lo menos 0,00001 g de extracto de *Vaccinium myrtillus* por kg de peso corporal y por día, y/o
- 55 - comprende una cantidad de piperina que permite la administración de por lo menos 0,001 mg de piperina por kg de peso corporal de la persona a la que se administra la composición y por día,
- comprende una cantidad de extracto único que corresponde a una administración de por lo menos 0,00001 g de extracto único por kg de peso corporal de la persona a la que se administra la composición y por día.
- 60

55

60

5. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la mezcla comprende por lo menos un ácido dicafeoilquínico, apigenina-7-O-glucurónido, un ácido monocafeoilquínico, piperina y oleuropeína.

65 6. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende además por lo menos un elemento complementario añadido además de la mezcla de moléculas, seleccionándose dicho elemento

complementario de entre:

- las vitaminas siguientes: B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12 C, A, D, E, K1 y K2;
  - 5 - los compuestos siguientes: ácido obeticólico, ácido corosólico, ácidos grasos poliinsaturados de la familia de los omega 6 y/o omega 3, ácido orótico, ácido pangámico, ácido para-amino-benzoico, amigdalina, betaglucanos, carnitina, dimetilglicina, imeglimina, isoflavonas, L-arginina, oxitocina, pectina, piridoxamina, resveratrol, viniferina, L-citrulina;
  - 10 - los oligoelementos y minerales siguientes: arsénico, boro, calcio, cobre, hierro, flúor, yodo, litio, manganeso, magnesio, molibdeno, níquel, fósforo, selenio, vanadio, cinc;
  - los microconstituyentes de carácter no indispensable siguientes: ácido linolénico conjugado, ácido lipoico, carotenoides, carnitina, colina, coenzima Q10, fitoesteroles, polifenoles de la familia de los taninos y de los lignanos, taurina;
  - 15 - los fructooligosacáridos, los galactooligosacáridos;
  - los fermentos lácticos;
  - 20 - las levaduras;
  - los hongos;
  - 25 - los productos derivados de insectos compatibles con el sector alimentario y farmacéutico;
  - la marihuana y el hachís;
  - los agentes de recubrimiento;
  - 30 - los aromas;
  - los acidificantes;
  - 35 - los antiaglomerantes;
  - los espesantes;
  - los estabilizantes;
  - 40 - los emulsionantes;
  - los agentes de carga;
  - 45 - los excipientes.
7. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que se presenta en forma de polvo, de gel, de emulsión o en forma líquida.
- 50 8. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que se presenta en forma de comprimidos, cápsulas, cápsulas duras, barras, sobres, ampollas, cuentagotas o en forma inyectable.
9. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, para su utilización como medicamento.
- 55 10. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 8, para su utilización como medicamento o producto de nutrición en la prevención y/o la lucha contra los desajustes patológicos del metabolismo glucídico y/o lipídico en un ser humano o animal.
- 60 11. Composición para su utilización según la reivindicación 9 o 10, en la prevención y/o la lucha contra las diabetes tipo 1 y 2 y/o las enfermedades del hígado graso no alcohólico y/o las patologías cardiovasculares y/o las patologías relacionadas con una insulinorresistencia.
12. Composición para su utilización según la reivindicación 11, caracterizada por que la enfermedad del hígado graso no alcohólico es la esteatosis hepática no alcohólica.
- 65 13. Composición para su utilización según la reivindicación 11, caracterizada por que las patologías

cardiovasculares son las cardiopatías coronarias, las enfermedades cerebrovasculares, las arteriopatías periféricas, las trombosis venosas profundas.

5 14. Composición para su utilización según la reivindicación 11, caracterizada por que la patología relacionada con una insulinoresistencia es la enfermedad de Alzheimer.

10 15. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 11 a 14, caracterizada por que se utiliza en combinación con por lo menos un agente terapéutico antidiabético seleccionado de entre las biguanidas de las cuales la metformina, los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), los análogos del péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), las tiazolidindionas (TZD), las sulfonilureas, las insulinas rápidas y lentas, los inhibidores del cotransportador de sodio glucosa 2 (SGLT2), los inhibidores de las glucosidasas (acarbose, miglitol, voglibosa, péptidos que contienen la secuencia alanina-prolina o prolina-alanina), las moléculas de la familia del fibrano como el elafibrano, o las moléculas que se dirigen a los receptores nucleares y particularmente los receptores ROR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) y Rev-Erb ( $\alpha$ ,  $\beta$ ).

15 16. Composición para su utilización según la reivindicación 9 o 10, en la prevención y/o la lucha contra la dislipidemia.

20 17. Composición para su utilización según la reivindicación anterior, caracterizada por que se utiliza en combinación con un agente terapéutico hipolipemiente seleccionado de entre: las estatinas, los fibratos, el ácido nicotínico, las resinas de intercambio iónico, los inhibidores de la absorción del colesterol, los ácidos grasos poliinsaturados omega 3, el tiadenol y los agonistas del receptor nuclear FXR (receptor X farnesoide).

25 18. Composición para su utilización según la reivindicación 9 o 10, en la prevención y/o la lucha contra la obesidad y el sobrepeso y/o el síndrome metabólico y/o los problemas patológicos de tensión arterial.

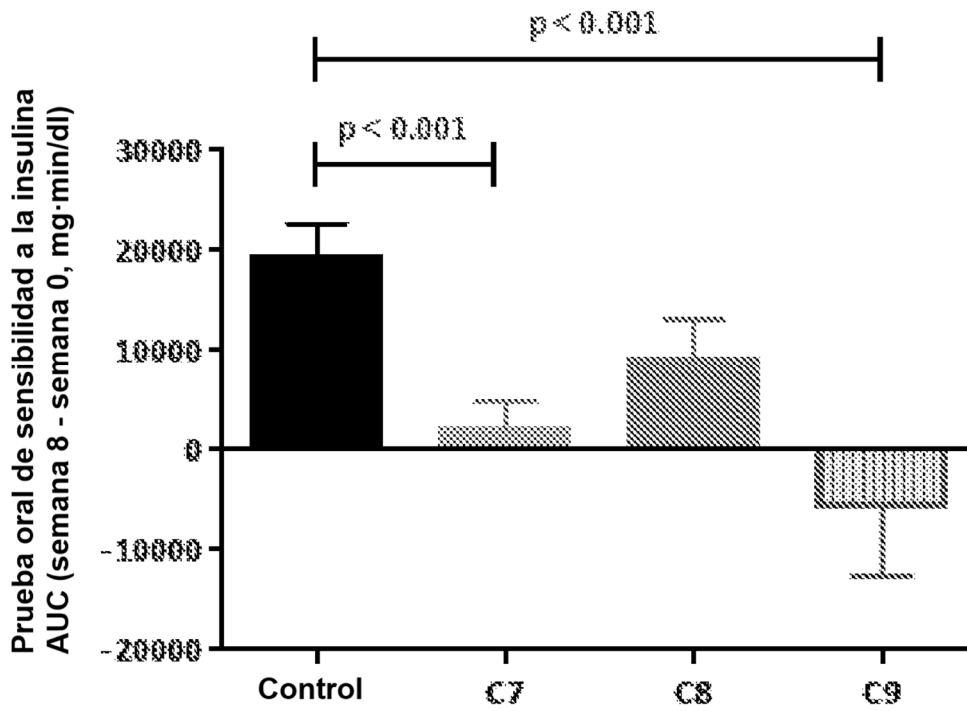


Figura 1

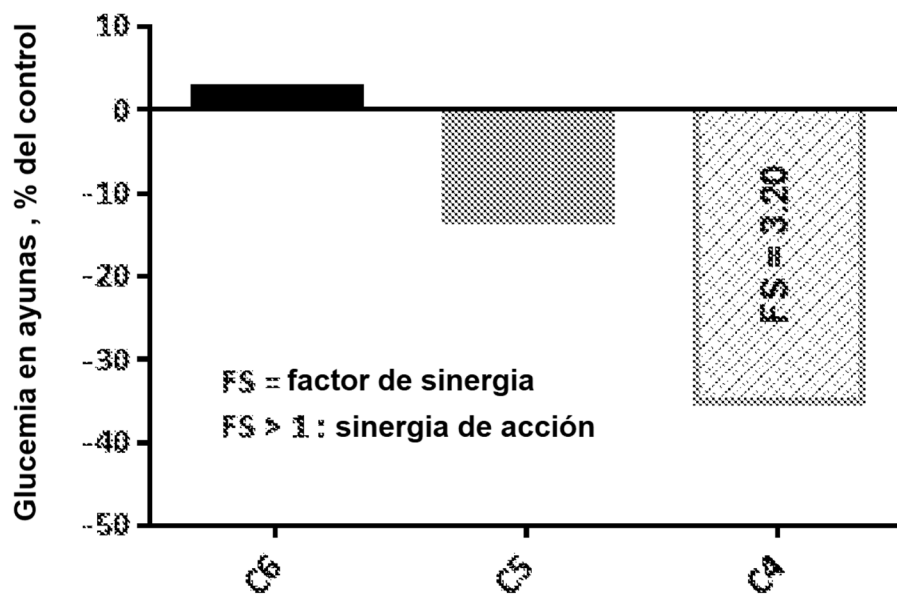


Figura 2



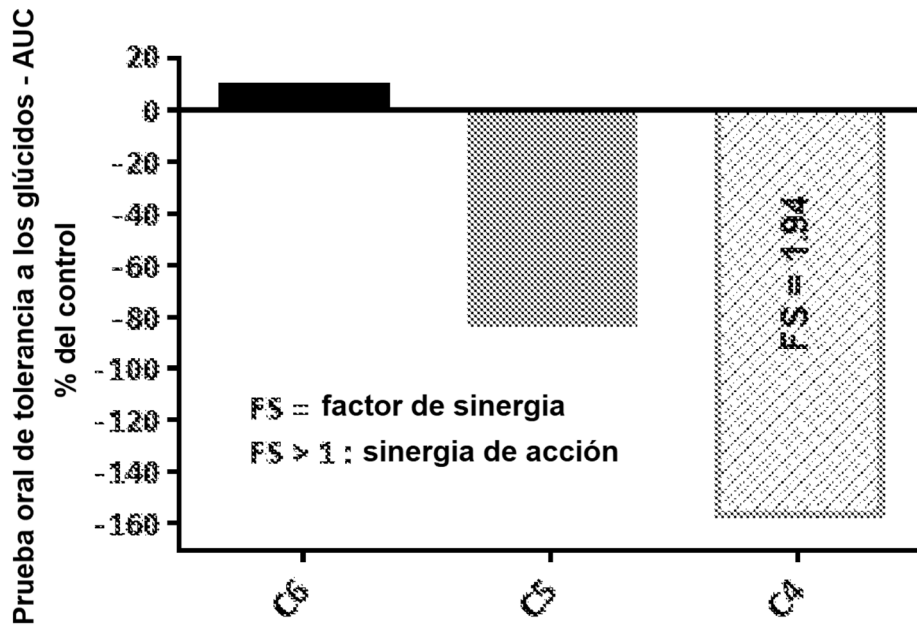


Figura 3

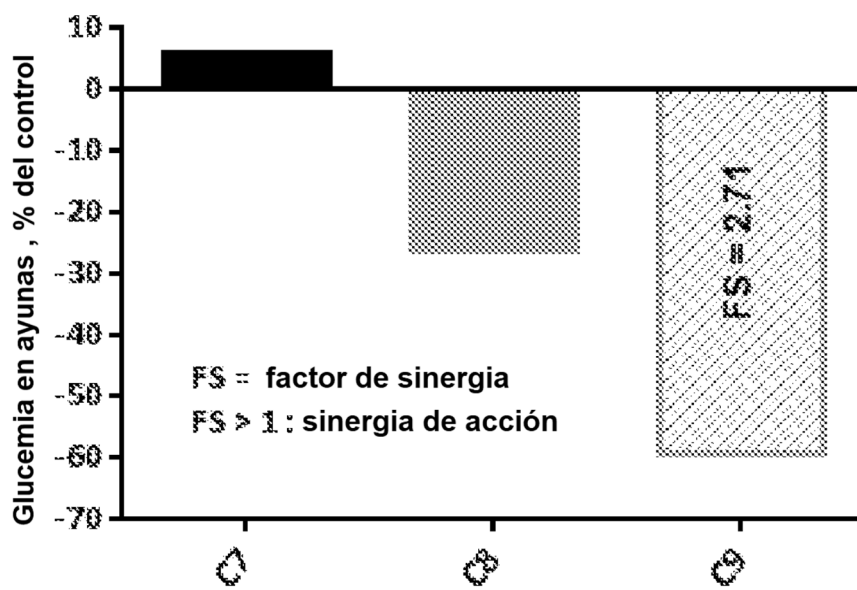


Figura 4

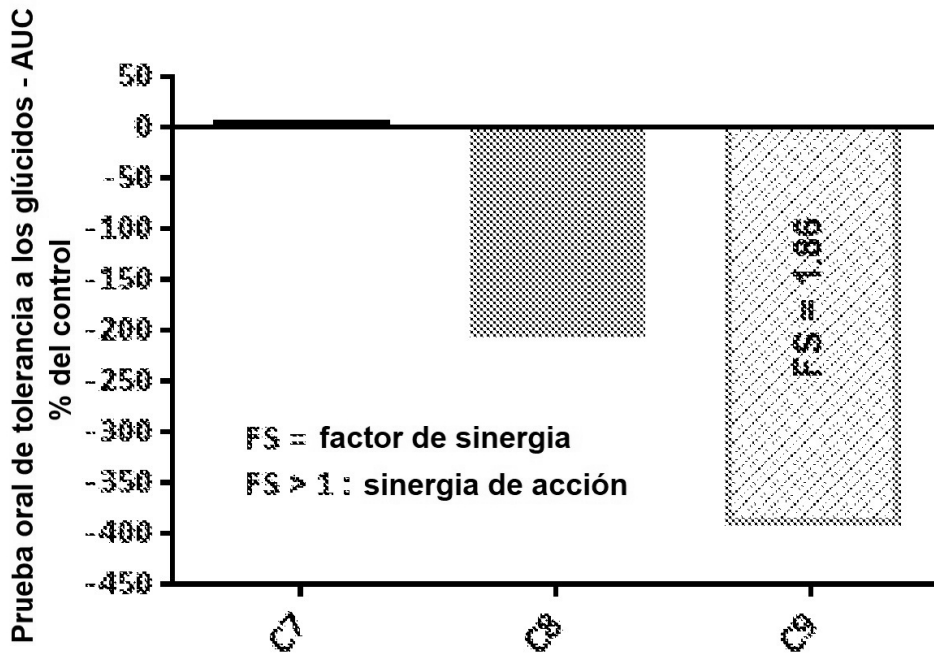


Figura 5

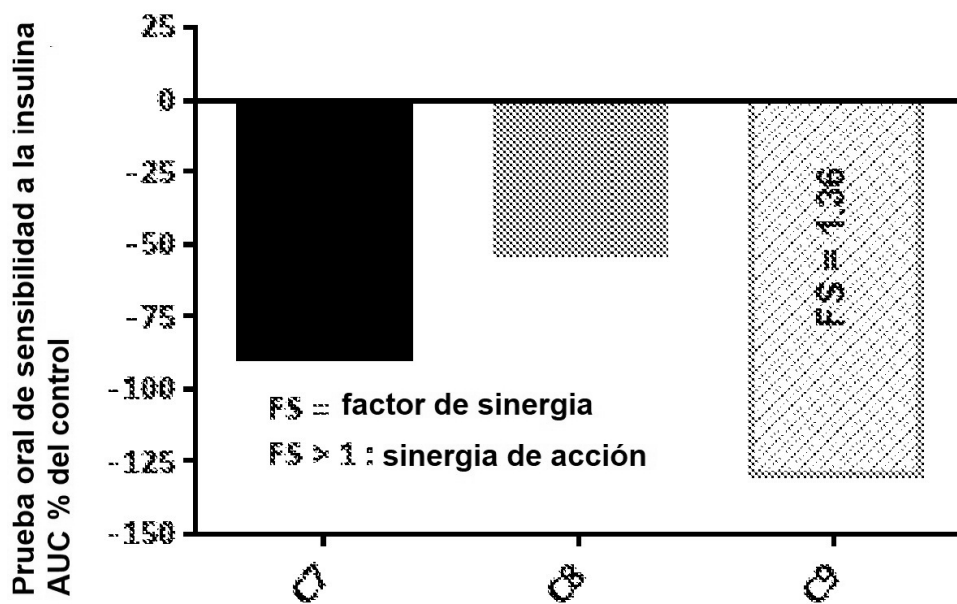


Figura 6

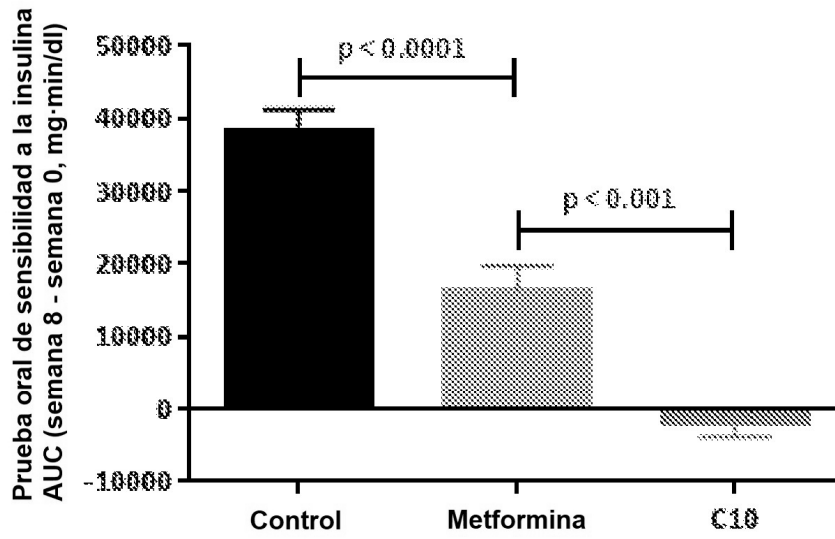


Figura 7

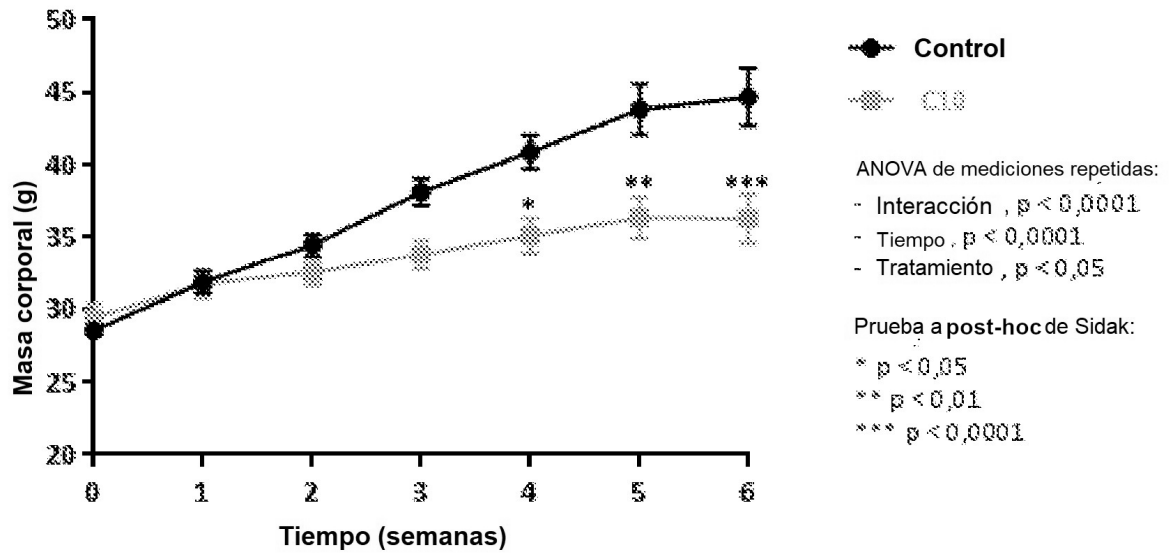


Figura 8

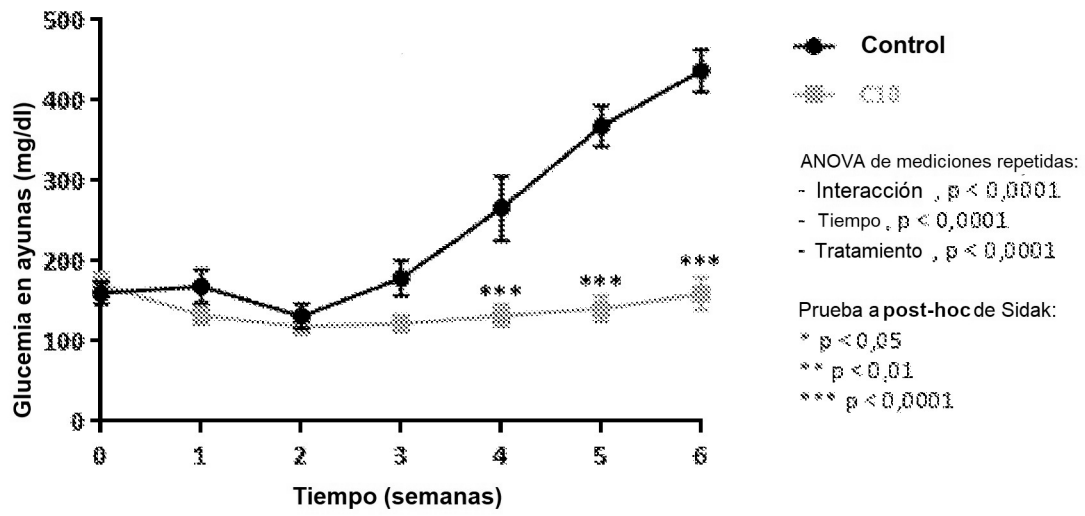


Figura 9

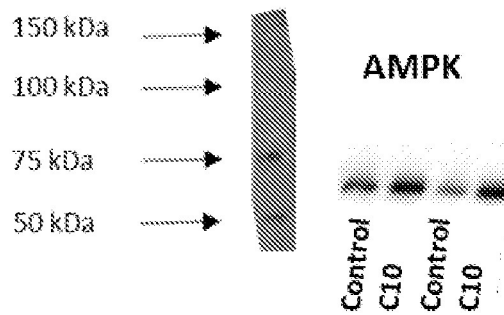


Figura 10

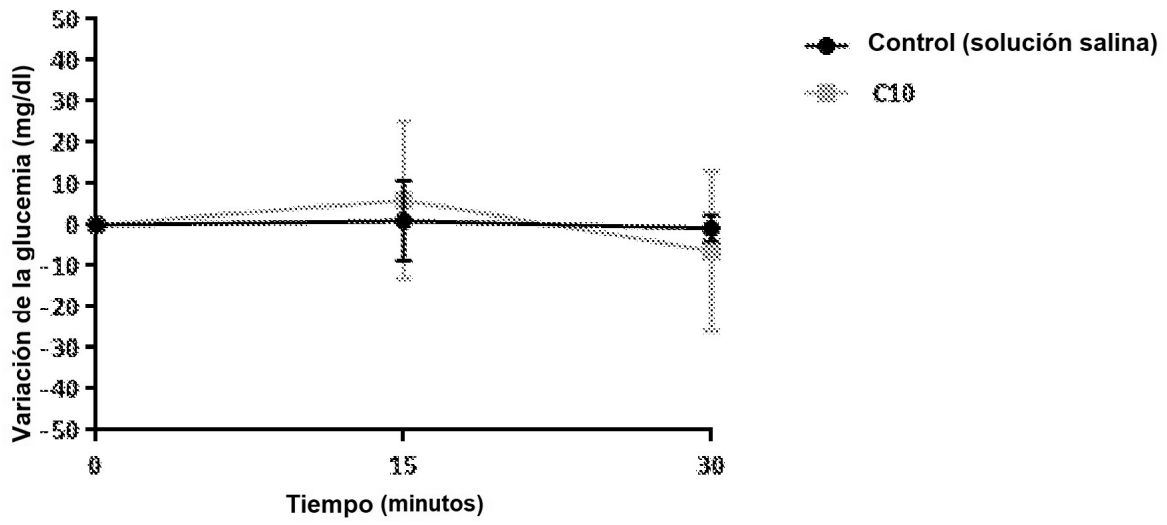


Figura 11

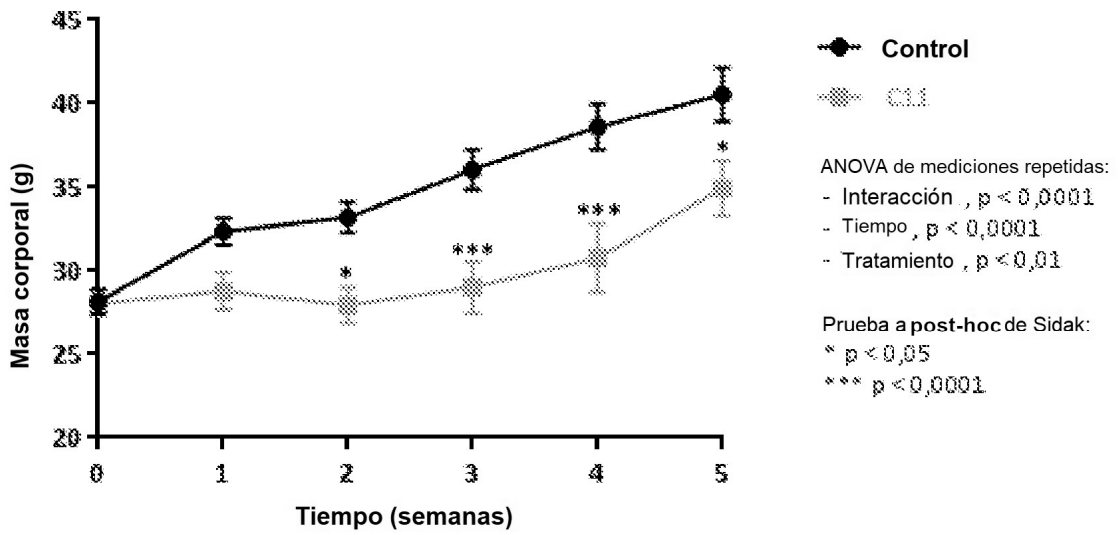


Figura 12