



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 632**

51 Int. Cl.:  
**A61K 36/185** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04713858 .1**

86 Fecha de presentación : **24.02.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1605958**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2005**

54

Título: **Composiciones de productos naturales y uso de las mismas.**

30

Prioridad: **21.03.2003 GB 0306568**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73

Titular/es: **UNILEVER N.V.**  
**Weena 455**  
**3013 AL Rotterdam, NL**

72

Inventor/es: **Yates, Paula Rachel**

74

Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 268 632 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composiciones de productos naturales y uso de las mismas.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden una combinación de isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas particulares.

**10 Antecedentes de la invención**

Las isoflavonas son conocidas como compuestos que se pueden aplicar para prevenir o tratar deficiencias de salud o para lograr ciertos efectos saludables no relacionados directamente con una deficiencia de salud. Por ejemplo, se conoce que logran beneficios en el área de la salud de la mujer, en particular para las mujeres posmenopáusicas. Los efectos saludables que se atribuyen a isoflavonas incluyen efectos antienvjecimiento de la piel y efectos antiinflamatorios.

Los materiales del lúpulo se han usado durante muchos años para impartir un sabor característico, amargo a las bebidas de cerveza. Las plantas de lúpulo pertenecen a la familia de las Cannabináceas. Los materiales de lúpulo usados en la producción de cerveza y otras bebidas de cerveza se derivan principalmente de una planta del género *Humulus* conocida como *Humulus lupulus L.* Los ingredientes aromatizantes claves obtenidos de plantas de lúpulo residen dentro de las estructuras de tipo cono que se recogen y usan en la fabricación de bebidas de cerveza. Los ingredientes aromatizantes principales en los conos de lúpulo conocidos como alfa-ácidos, que se convierten en ácidos isoalfa durante el proceso de ebullición.

**25 Sumario de la invención**

Los inventores han encontrado ahora que los isoalfa ácidos encontrados en lúpulos y extractos de lúpulo pueden actuar de manera sinérgica en combinación con ciertas isoflavonas, en particular en la regulación hacia abajo de la producción de la prostaglandina E<sub>2</sub>, parte de la respuesta inflamatoria, después del estrés oxidante. De acuerdo con lo anterior, una combinación de isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas se puede usar para lograr efectos antienvjecimiento y antiinflamatorios.

De acuerdo con lo anterior, en un primer aspecto la presente invención proporciona una composición que comprende isoalfa ácidos de lúpulo y una o más isoflavonas seleccionadas entre genisteína, genistina, daidzeína, daidzina, gliciteína y glicitina, en las que la relación de extractos de isoalfa ácidos de lúpulo a isoflavonas está entre 1:50 a 50:1, calculado como aglucón.

Preferiblemente, la composición comprende genisteína/genistina y daidzeína/daidzina, preferiblemente presentes en una relación de peso de genisteína/genistina a daidzeína/daidzina de entre 2:1 a 1:2, calculada como aglucón, más preferiblemente entre 2:1 a 1:1. También se prefiere que la composición comprenda gliciteína y/o glicitina.

Preferiblemente las isoflavonas se derivan de plantas leguminosas, más preferiblemente soja.

En una realización preferida, los isoalfa ácidos de lúpulo se seleccionan entre isoalfa ácidos reducidos, dihidro isoalfa ácidos y tetrahidro - isoalfa ácidos, y las mezclas de los mismos.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una forma de dosificación que comprende una composición de la invención, en el que la forma de dosificación comprende entre 10 mg y 200 mg de dichos isoalfa ácidos de lúpulo y entre 10 mg y 200 mg de dichas isoflavonas. Preferiblemente la forma de dosificación es una forma de dosificación oral tal como un comprimido.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un producto alimentario que comprende una composición de la invención. Preferiblemente la cantidad de dichos isoalfa ácidos de lúpulo y dichas isoflavonas presentes en el producto alimentario está entre 20% y 100% de la ingesta diaria recomendada total (= cantidad RDI) de los isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas por ración.

En una realización preferida, el producto alimentario contiene 20 mg a 400 mg de una combinación de dichos isoalfa ácidos de lúpulo y dichas isoflavonas, por ración recomendada.

La presente invención también proporciona una composición que comprende una combinación de isoalfa ácidos de lúpulo y una o más isoflavonas seleccionadas entre genisteína, genistina, daidzeína, daidzina, gliciteína y glicitina para uso en la promoción de la formación de colágeno y/o decorina en la piel de un animal o ser humano; para uso en la reducción de los efectos de envejecimiento en la piel de un animal o ser humano; y/o para uso en el tratamiento o prevención de los efectos de inflamación en un animal o ser humano.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona el uso de una composición saludable que comprende una composición de producto alimentario de la invención en la que la composición o producto alimentario se aplica

para lograr beneficios en la piel y efectos relacionados con la piel tales como efectos antienvjecimiento o para promover la formación de colágeno o para promover la formación de decorina en la piel. También se proporciona el uso de dicha composición saludable en la que la composición se aplica para la producción de un alimento funcional con propiedades antiinflamatorias.

5

### Descripción detallada de la invención

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria descriptiva tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por los expertos en la técnica.

10

#### *Isoalfa ácidos*

Los materiales del lúpulo se han usado durante muchos años para impartir un sabor característico, amargo a las bebidas de cerveza. Las plantas de lúpulo pertenecen a la familia de las Cannabináceas. Los materiales de lúpulo usados en la producción de cerveza y otras bebidas de cerveza se derivan principalmente de una planta del género *Humulus* conocida como *Humulus lupulus L.* Los ingredientes aromatizante clave obtenido de plantas de lúpulo residen dentro de las estructuras de tipo cono que se recogen y usan en la fabricación de bebidas de cerveza. Los ingredientes aromatizantes principales en los conos de lúpulo conocidos como “alfa-ácidos”.

15

El lúpulo contiene alfa ácidos, beta ácidos y gamma ácidos. Los más importantes son los alfa ácidos, o humulonas, que se caracterizan como humulona, cohumulona, ad humulona, pre humulona y post humulona. La cantidad relativa de ad humulona es casi constante entre variedades mientras que las cantidades relativas de humulona y cohumulona dependen de la variedad.

20

La mayoría de los alfa ácidos presentes en lúpulo, con sus proporciones aproximadas (% en peso) en paréntesis son Humulona (35 - 70%), Cohumulona (20 - 65%), Adhumulona (10 - 15%), Prehumulona (1 - 10%), y Posthumulona (1 - 3%) - véase la patente de Estados Unidos n° 5.478.580. Estos análogos se diferencian uno de otro en la naturaleza de una cadena lateral acilo.

25

Los alfa ácidos se pueden isomerizar para formar isoalfa ácidos, que son la forma usada como agentes aromatizantes en la producción de bebidas de cerveza. El término “isoalfa ácidos” abarca las formas isómeras tanto cis como trans de alfa ácidos. Además de las formas no reducidas de isoalfa ácidos, existen tres tipos de isoalfa ácidos reducidos, a saber dihidro - isoalfa ácidos (DHIA), también conocidos como “rho ácidos”, tetrahidro - isoalfa ácidos (THIA), y hexahidro - isoalfa ácidos (HHIA). De acuerdo con lo anterior, el término “isoalfa ácidos” abarca las formas tanto no reducidas y reducidas. Las preparaciones de isoalfa ácidos en el contexto de la presente invención comprenden uno o más de las formas isómeras de los cinco alfa ácidos principales encontrados en el lúpulo descrito anteriormente, es decir, humulona, cohumulona, ad humulona, pre humulona y post humulona, preferiblemente las formas isómeras de los cinco.

30

Los alfa ácidos de lúpulo se obtienen típicamente en la forma de un extracto de lúpulo líquido. Los extractos de lúpulo líquidos son productos comerciales que se conocen bien en la técnica y se producen mediante la extracción química de conos de lúpulo con materiales disolventes seleccionados para retirar los alfa ácidos. En el pasado, la extracción se acometió usando disolventes orgánicos incluyendo pero sin limitación a cloruro de metileno, hexano, y metanol. Sin embargo, los recientes avances técnicos han dado como resultado el desarrollo de procedimientos de extracción que implican el uso de dióxido de carbono líquido o dióxido de carbono supercrítico. De este modo, se prefiere que los isoalfa ácidos de acuerdo con la presente invención se deriven de un extracto de lúpulo en CO<sub>2</sub>, tales como disolventes, que se prefiere cuando los extractos a usar posteriormente para aplicaciones cosméticas o farmacéuticas. El extracto líquido de lúpulo en CO<sub>2</sub> está comercialmente disponible a partir de una diversidad de fuentes, incluyendo, pero sin limitación a Pfizer, Inc. y John I. Haas Co., Estados Unidos. La información con relación a la producción de los extractos de lúpulo se proporciona en Hough, J. S., y col., *Malting and Brewing Science*, Vol. 2, Chapman and may, Ltd., Cambridge (1982), p. 403 - 405.

40

Los alfa ácidos se puede, si se desea, separar a partir de otros componentes tales como beta ácidos y/o la fracción no ácida, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito en la patente de Estados Unidos N° 4.666.731.

45

Existen numerosos procedimientos en los que se puede lograr la isomerización de alfa ácidos en materiales de lúpulo (por ejemplo, conos y extractos). Por ejemplo, los materiales de lúpulo (por ejemplo lúpulo o extractos de lúpulo) se pueden someter a ebullición en soluciones altamente alcalinas (por ejemplo, NaOH). Cuando se usa este procedimiento, se debe tener cuidado para evitar niveles de pH por encima de 9,0 ya que la degradación de lo isoalfa ácidos resultantes puede tener lugar a tales niveles.

55

Otro procedimiento para la producción de isoalfa ácidos de implica el uso de materiales de isomerización metálicos - véase por ejemplo la patente de Estados Unidos n° 5.015.491 que describe un procedimiento en el que un extracto de lúpulo se combina con una sal de metal alcalino o alcalinotérreo (por ejemplo MgO) a una temperatura de al menos aproximadamente 80°C. Otro procedimiento se describe en la patente de Estados Unidos n° 5.478.580. Los extractos de lúpulo que contienen isoalfa ácidos se pueden obtener comercialmente a partir de Botanix Ltd,m Reino Unido (“Isohops”).

65

## ES 2 268 632 T3

Las formas reducidas de isoalfa ácidos, DHIA y HHIA, se pueden obtener mediante tratamiento de isoalfa ácidos con borohidruros tales como borohidruro de sodio y/o borohidruro de potasio. El documento de Estados Unidos n° 3.965.188 describe la producción de DHIA a partir de alfa ácidos mediante un procedimiento de isomerización/reducción simultánea. Este procedimiento da como resultado al forma cis mientras que el documento de Estados Unidos n° 6.583.322 describe un procedimiento para producir una alta relación de estereoisómeros cis a trans mediante etapas de isomerización y reducción separadas. Los HHIA también se pueden obtener mediante reducción de los THIA.

Otra forma reducida de isoalfa ácidos, los THIA, se pueden producir a partir de alfa ácidos o beta ácidos de lúpulo mediante hidrogenación en presencia de un catalizador de metal noble, tal como paladio - véase por ejemplo la patente de Estados Unidos n° 5.012.571 y la patente de Estados Unidos n° 5.600.012 así como el documento de Hay y Homiski, 1991, "Efficient One - Step Preparation" of the Beer Additive Tetrahydroisoalpha-Acids, J. Agric. Food. Chem. 39: 1732 - 1734.

Las formas reducidas de los isoalfa ácidos están también disponibles A partir de fuentes comerciales tales como Botanix Ltd. Reino Unido y Pfizer, Inc. Estados Unidos.

Los isoalfa ácidos de lúpulo que se pueden usar de acuerdo con la invención se derivan de manera adecuada de fuentes naturales como se ha descrito anteriormente, por ejemplo como extractos de lúpulo. El lúpulo contiene, entre otros, alfa, beta y gamma ácidos. Los isoalfa ácidos son una forma isómera particular de los alfa ácidos. Los alfa ácidos de lúpulo están comercialmente disponibles en forma de extracto de isolúpulo purificado de Botanix Ltd. La parte de ácido de lúpulo de la fracción de la resina suave contiene los alfa y beta ácidos relacionados. Las resinas gamma son duras, y no contribuyen nada a la elaboración. Los más importantes son los alfa ácidos, o humulonas, que se caracterizan como humulona, cohumulona, ad humulona, pre humulona y post humulona. La cantidad relativa de ad humulona es casi constante entre variedades mientras que las cantidades relativas de humulona o cohumulona dependen de la variedad.

Los extractos de lúpulo de isoalfa ácidos están comercialmente disponibles en formas que pueden realmente contener una mezcla de especies moleculares. Típicamente, los extractos de lúpulo de isoalfa ácidos comprenden al menos 10% p/p de isoalfa ácidos y las formas reducidas y/o no reducidas descritas anteriormente.

El uso de extractos de lúpulo de isoalfa ácidos aislados, es decir purificados evita la inclusión de los compuestos potencialmente estrogénicos encontrados en lúpulos. Por consiguiente, se prefiere que los isoalfa ácidos, y los extractos de lúpulo que comprenden isoalfa ácidos, están sustancialmente libres de compuestos estrogénicos, tales como 8-prenilnaringeína, es decir contiene menos de 0.1% en peso de compuestos estrogénicos, más preferiblemente menos que 0,01% en peso de compuestos estrogénicos.

También se prefiere que las preparaciones de isoalfa ácidos de lúpulo están sustancialmente libres de beta ácidos de lúpulo y/o alfa ácidos de lúpulo isomerizados, es decir, contienen menos 1% de beta ácidos y/o menos que 1% de alfa ácidos, más preferiblemente menos que 1% de beta ácidos y/o menos que 0,1% de alfa ácidos.

### *Isoflavonas*

Las isoflavonas son compuestos polifenólicos. Las isoflavonas se encuentran en la naturaleza tanto en la forma no glicosados (agluconas) y en formas glicosiladas (glucosas), especialmente como O-glicósidos.

Las isoflavonas más preferidas en las composiciones de la invención son genisteína, daidzeína y gliciteína (o como glucosas, es decir, en forma glicosilada, que se conocen como genistina, daizina y glicina, respectivamente). Se prefiere especialmente que las isoflavonas se seleccionen entre genistina (gluco), adivina (glucon) y glicitina (glucon). Preferiblemente la composición comprende genisteína (o genistina), daidzeína (o daidzina) y gliciteína (o glicina). Aunque las isoflavonas se pueden aplicar en un amplio intervalo de relaciones los mejores resultados se obtuvieron cuando la genisteína y daidzeína se usaron en relaciones de peso de 2:1 a 1:2.

Las isoflavonas se derivan preferiblemente de fuentes naturales, típicamente materiales vegetales - incluyendo extractos y/o concentrados de los mismos. Las fuentes preferidas de las isoflavonas son legumbres, tales como soja, garbanzos y/o trébol, y extractos y/o concentrados de los mismos. Se prefiere que la fuente de la planta sea una planta o material vegetal distinto de lúpulo o los extractos de los mismos - lúpulo no sintetizan realmente estas isoflavonas ya que la ruta metabólica relevante no es activa.

### *Composiciones*

Las composiciones de la presente invención comprenden isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas, como se ha descrito anteriormente, como agentes activos.

Los agentes activos se pueden combinar con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una forma de dosificación sistémica. Los diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables para uso en tales composiciones se conocen bien en la técnica de farmacia.

## ES 2 268 632 T3

Las formas de dosificación sistémica pueden consistir en formas de dosificación sólidas tales como comprimidos, cápsulas duras de gelatina, cápsulas blandas de gelatina, polvos a granel, y microcápsulas de los principios activos. Como alternativa, puede consistir en una forma de dosificación líquida tal como una solución, emulsión, o suspensión acuosa o no acuosa.

5

Las formas de dosificación sólidas para la administración oral son las composiciones preferidas de la invención. Las formas de dosificación sólidas se preparan preferiblemente en forma de dosificación unitaria, tal como en la forma de comprimidos y cápsulas. Los comprimidos se pueden preparar de manera adecuada mezclando la combinación activa con un diluyente inerte tal como fosfato de calcio en presencia de agentes disgregantes, por ejemplo almidón de maíz, y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, y formando comprimidos la mezcla mediante procedimientos conocidos. Tales como comprimidos pueden, si se desea, proporcionarse con revestimientos entéricos, por ejemplo mediante el uso de celulosa acetato ftalato. De manera similar, las cápsulas, por ejemplo cápsulas de gelatina duras o blandas, que contienen la combinación de principios activos opcionalmente en la forma de perlas con o sin los excipientes añadidos, se pueden preparar mediante medios convencionales y, si se desea, proporcionarse con revestimientos entéricos de una manera conocida. Los comprimidos se pueden formular de una manera conocida por los expertos en la técnica de manera que proporcionen una liberación controlada del compuesto de la presente invención.

Las formas de liberación controlada de las formas de dosificación de la presente invención incluyen formulaciones de liberación rápida tales como gránulos solubles o cápsulas de liberación rápida llenadas por fusión, formulaciones de liberación retrasada tales como comprimidos provistos de revestimientos entéricos, por ejemplo, de celulosa acetato ftalato y, en particular, formulaciones de liberación sostenida. Los expertos en la técnica conocen numerosos tipos de liberación sostenida. Típicamente, la combinación de compuestos activos se pueden encapsular dentro de un revestimiento que retrasa la liberación, por ejemplo, un copolímero de celulosa éter y acrilato, o se puede unir a pequeñas partículas tales como, por ejemplo, perlas de resina de intercambio iónico. Como alternativa, la combinación de compuestos activos se puede incorporar en una matriz que contiene un agente que retrasa la liberación tal como goma hidrófila, por ejemplo goma de xantano, un derivado de celulosa, por ejemplo hidroxipropilmetilcelulosa, o un polisacárido, cera o materiales de plástico.

La combinación de principios activos se puede formular en una forma de dosificación sólida en la que los dos ingredientes activos se mantienen separados. Por ejemplo, la forma de dosificación puede ser un comprimido de dos capas en el que los ingredientes están contenidos en capas diferentes. Las capas diferentes se pueden formular de manera que proporcionen el perfil óptimo de liberación para cada fármaco.

Las composiciones de llenado líquidas por ejemplo cargas líquidas viscosas, cargas de pasta líquidas o cargas líquidas tixotrópicas son también adecuadas para la administración oral. Las composiciones llenadas por fusión se pueden obtener mezclando la combinación de ingredientes activos con ciertos ésteres de ácidos grasos de aceite vegetal natural, por ejemplo, la gama Gelucire™ disponible de Gattefosse para proporcionar una diversidad de velocidades de liberación.

40

Las formas de dosificación adecuadas para la administración parenteral se puede preparar mediante la combinación de (del) principio (s) activo (s) con formas farmacéuticas conocidas para tal administración, por ejemplo suspensiones estériles o soluciones estériles del principio activo en un disolvente adecuado tal como solución salina.

45 El modo preferido de administración es por vía oral.

Otros medios de dosificación sistémica comprende la dosificación de las composiciones anteriormente mencionadas en un producto alimentario que por lo tanto no típica ni necesariamente incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50

Como se usa en esta memoria descriptiva, el término “productos alimentarios” incluye tanto productos alimentarios como tales como bebidas. Los productos alimentarios adecuados como tales incluyen cobertores tales como margarinas, productos lácteos (incluyendo leche y yogures), mayonesas, salsas, alimentos/refrigerios de conveniencia, cargas, confiterías, barras saludables, cereales de desayuno y barras de cereales, comidas listas para cocinar, pan y dulces congelados tales como helados, hielos y sorbetes y helados de yogur. Los productos alimentarios también incluyen suplementos dietarios/nutricionales. Las bebidas adecuadas incluyen té, bebidas de sabor de té, café, refrescos (por ejemplo, zumos carbonatados, etc.) zumo de frutas y bebidas saludables.

Los productos alimentarios están típicamente suplementados con los ingredientes activos de la invención se manera que contengan cantidades mayores de (del) ingrediente (s) activo (s) que deberían normalmente contener.

La cantidad de isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas presentes en la composición variará dependiendo del tipo de formulación. Por ejemplo, una forma de dosificación oral tal como un suplemento nutricional o composición farmacéutica generalmente comprenderá un porcentaje mayor de los ingredientes activos que un producto alimentario para lograr la dosis deseada. De este modo, típicamente, una forma de dosificación oral comprenderá entre 0,01 y 99% en peso de los isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas, preferiblemente entre 0,1 y 50% en peso. Preferiblemente, la cantidad total de isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas por forma de dosificación es al menos 10 ó 20 mg, más preferiblemente al menos 50, 100 ó 200 mg.

65

## ES 2 268 632 T3

Un producto alimentario de la invención típicamente comprende entre 0,01% en peso y 1% en peso de isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas, siendo el % en peso menor que en un suplemento nutricional u otra forma de dosificación oral debido a la mayor masa ingerida para un producto alimentario típico que un suplemento o comprimido. Preferiblemente, la cantidad total de isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas por ración es al menos 10 ó 20 mg, más preferiblemente al menos 50, 100 ó 200 mg. Una ración puede constituir el producto alimentario entero, como en el caso de un producto de confitería o producto partido individualmente, o una proporción del producto alimentario.

La relación de peso de isoalfa ácidos de lúpulo a isoflavonas puede variar en un amplio intervalo. Sin embargo, generalmente se prefiere que tenga una relación de peso en el intervalo entre 1:50 a 50:1, preferiblemente relaciones de 1:20 a 20:1, más preferiblemente relaciones de 1:6 a 6:1 e incluso más preferiblemente entre 1:4 a 4:1 y lo más preferiblemente entre 1:2 a 2:1 o 1:2 a 1:1, calculada como aglución (es decir, cuando se usan las formas glicosiladas de isoflavonas, el peso molecular de restos de azúcar se desecha).

A modo de ejemplo, un producto alimentario de la invención puede contener una mezcla en la que el contenido de alfa ácidos de lúpulo está presente en cantidades de entre 10 mg y 200 mg por RDI (ingesta recomendada diaria), mientras que las isoflavonas están presentes en cantidades de entre 10 mg y 200 mg por RDI. De esta forma los componentes saludables se pueden distribuir como parte de las raciones diarias del producto alimentario.

De acuerdo con otra realización de la invención, la invención también se refiere a productos alimentarios que contienen un componente saludable (= alimento funcional) en el que el producto alimentario comprende una cantidad de la composición de acuerdo con la presente invención, de manera que la ingesta diaria recomendada (= RDI) total de los componentes saludables se distribuya mediante una o dos raciones, tales como dos, tres, cuatro o cinco, al día del producto alimentario.

En estos productos alimentarios 20 a 400 mg, por ejemplo, ingesta diaria recomendada de las composiciones sinérgicas de acuerdo con la invención pueden estar presentes. Debido a la interacción sinérgica entre los isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas, el producto alimentarios puede contener menos de los principios activo individuales, que de otra manera se requeriría para lograr efectos similares. De esta forma el comportamiento del producto alimentario no está afectado de manera negativa por la presencia de las cantidades excesivas de la mezcla sinérgica de los componentes saludables mientras que se obtienen los beneficios saludables.

Además de los componentes anteriores las mezclas y los productos alimentarios pueden contener otros micronutrientes, siendo los ejemplos de los mismos antioxidantes (vitamina C o vitamina E), otras vitaminas en particular vitamina B1, B6 y B12, vitamina K, ácido fólico, minerales como calcio, magnesio, hierro, cobre, o cinc, sin embargo, también pueden estar presentes emulsionantes así como cantidades menores de ácidos grasos poliinsaturados, n particular DHA y EPA y en particular aceites de pescado (desodorizados) o los concentrados de los mismos.

### Usos

Una combinación de los isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas como se definen en esta memoria descriptiva, tales como están presentes en composiciones y productos alimentarios de la presente invención se pueden usar para lograr ciertos efectos saludables, en particular ciertos efectos cosméticos. En particular, los inventores han encontrado ahora que los isoalfa ácidos encontrados en lúpulo y extractos de lúpulo pueden actuar de manera sinérgica en combinación con estas isoflavonas en la regulación hacia abajo de prostaglandinas E<sub>2</sub>, parte de la respuesta inflamatoria, después del estrés oxidante. De acuerdo con lo anterior, una combinación de isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas se puede usar para lograr efectos antienvjecimiento y antiinflamatorios. Especialmente, una combinación de los isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas se pueden usar para inhibir la producción de prostaglandinas E<sub>2</sub> en respuesta a estrés, y/o para incrementar la síntesis de procolágeno - 1 en la piel y/o incrementar la síntesis de decorina en la piel.

Por lo tanto la presente invención también se refiere al uso de una composición que comprende uno o más los isoalfa ácidos de lúpulo y una o más isoflavonas como se han definido en esta memoria descriptiva, en la que la composición o producto alimentario se aplica para lograr efectos cosméticos, en particular beneficios cutáneos y efectos relacionados con la piel tales como efectos antienvjecimiento o para promover la formación de procolágeno/colágeno o para promover la formación de decorina en la piel. Además la invenciones refiere al uso de una composición saludable que comprende isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas en la que la composición saludable es la mezcla de acuerdo con la invención y en la que la mezcla se aplica para la producción de un flujo funcional con propiedades antiinflamatorias con un efecto sinérgico sobre las propiedades antiinflamatorias y relacionadas con la salud.

La presente invención se describirá ahora en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos que son solamente ilustrativos y no limitantes.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 5 *Los isoalfa ácidos incrementan la síntesis de procolágeno y decorina en las células de la piel*

##### *Cultivo de fibroblastos dérmicos humanos*

Se explantaron fibroblastos dérmicos de prepucios humanos neonatales de donantes de 6 meses a 6 años de edad. Las células se cultivaron en medio de Tagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con FCS al 20% a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. El cultivo se recogió en el primer pase (P1) y el grueso de las células se almacenaron en viales criogénicos en nitrógeno líquido para la expansión posterior y uso en P2.

##### *Preparación de cultivos de fibroblastos para la selección de los compuestos de ensayo*

Se sembraron fibroblastos de prepucios humanos neonatales en el segundo pase (P2) en matraces de 175 cm<sup>3</sup> o placas de 12 pocillos a una densidad de siembra de 10.000 células/cm<sup>3</sup> en DMEM suplementado con FCS al 10%. El matraz se incubó a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%/O<sub>2</sub> al 4%. Después de 24 horas de incubación las monocapas de células se lavaron con DMEM libre de suero y se incubaron con DMEM libre de suero reciente durante 72 horas adicionales. Los fibroblastos se lavaron otra vez con DMEM libre de suero antes de la adición de los compuestos de ensayo. La mayoría de trabajo se llevó a cabo en las líneas celulares 500, 501, 502 y 386.

##### *Preparación de los compuestos de ensayo y adición a células*

Los extractos de lúpulo se prepararon como soluciones madre en mg/ml en etanol al 100%. Se usó rara vez dimetilsulfóxido (DMS) como disolvente (ya que puede actuar como agente antiinflamatorio en concentraciones suficientemente altas). Para evitar este efecto cuando era necesario usar DMSO, los compuestos se prepararon como soluciones madre 100 mM y se aseguró que las células no se expusieran a concentraciones de DMSO mayores que 0,1%.

Los compuestos se añadieron por triplicado a las placas de 12 pocillos (0,4 ml/pocillo). Las monocapas de fibroblastos se incubaron con los ingredientes activos durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%/O<sub>2</sub> al 4%. Después de 24 horas de incubación, el sobrenadante de los pocillos tratados por triplicado se vertió y se colocó sobre hielo para ensayo inmediato o se congeló de manera rápida en nitrógeno líquido para almacenamiento a -80°C para análisis en una fecha posterior.

##### *Recuento de células*

Las células que quedan en los pocillos después de tratamiento se contaron para propósitos de normalización de señal. Los números de células pueden variar debido a diferentes tratamientos debido a toxicidad (que generalmente reduce los números de células) o acción proliferativa/mitógena (que incrementa el número de células) y posteriormente afectan a los niveles de secreción de procolágeno - 1 y decorina. Las células adherentes restantes se trataron con 0,5 ml 1 x de tripsina durante 15 minutos a 37°C después de este tiempo la tripsina se neutralizó con 0,5 ml de DMEM suplementado con FCS al 10%. Los pocillos por triplicado de células se reunieron y 0,5 ml de células reunidas se añadieron a 9,5 ml de Isoton II en un recipiente de conteo. Los números de células se determinaron usando un contador Coulter (Beckman), contando dos veces, añadiendo los números juntos y multiplicando por 20 para proporcionar el número de células/ml.

##### *Análisis de transferencia de puntos de procolágeno 1 y Decorina en medio acondicionado de fibroblastos*

El medio acondicionado reunido no tratado y tratado de las placas de 12 pocillos se aplicó por triplicado a membrana de transferencia Immobilon - P usando el aparato Bio - Dot de 96 pocillos se Biorad como se describe en las líneas directrices del fabricante. Cuando se ensaya para determinar decorina las muestras se mezclaron mediante un aparato Vórtex y se aplicaron directamente a la membrana por triplicado. 190 µl de muestra se añadieron por pocillo. Cuando se ensaya para determinar el procolágeno - 1 se requería una etapa de desnaturalización adicional. Se añadieron 60 µl de DTT 200 mM y 6 µl de SDS al 10% y las muestras se calentaron hasta 80°C durante 2 minutos y se mezclaron brevemente mediante aparato Vórtex antes de añadir 190 µl por triplicado a la membrana en el aparato de transferencia de puntos. Se dejó que las muestras se filtraron a través de la membrana por gravedad, permitiendo que la proteína se adhiriera a la membrana y el medio a retirar después de lo cual la membrana se lavó tres veces con PBS (dos veces por gravedad y una vez usando succión). Se retiró la membrana del aparato y se bloqueó en tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante una hora (5% p/v de leche en polvo desnatada seca disuelta en PBS/Tween 20 al 0,05%).

Se probaron las membranas para contenido en decorina y procolágeno - 1 con anticuerpo primario diluido (antidecorina 1/3333 en PBS/Tween 20 al 0,05%, 1/1000 anti-procolágeno en 5% p/v de leche en polvo desnatada seca/PBS/Tween 20 al 0,05%) durante toda una noche a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tres veces con PBS/Tween 20 al 0,05% durante 20 minutos por lavado antes de que se incubaran con 125 l de anticuerpos conjugados (anti-ratón diluido 1/333 en PBS/Tween 20 al 0,05% para decorina y anti-rata 1/1000 para procolágeno - 1 en 5% p/v de leche en polvo desnatada seca/PBS/Tween 20 al 0,05%) a temperatura ambiente durante 2 horas. La mem-

## ES 2 268 632 T3

brana se lavó tres veces con PBS/Tween 20 al 0,05% durante 20 minutos por lavado y se dejó secar al aire brevemente. Las membranas se envolvieron en envoltura Saran<sup>®</sup>, las arrugas se alisaron y se expusieron a un tamiz de fósforo de almacenamiento Molecular Dynamics durante al menos 18 horas.

### 5 *Análisis y cuantificación de la síntesis de Procolágeno - 1 y Decorina*

La selección expuesta se exploró mediante el Molecular Dynamics Phosphoimager SF usando el software ImageQuant<sup>®</sup>. La intensidad de la señal se cuantificó mediante imagen asistida por ordenador usando las herramientas de cuantificación en ImageQuant<sup>®</sup>. Las intensidades de las señales que emanan de las muestras de ensayo se relacionaron con las señales emitidas de las muestras control. Los efectos de los compuestos de ensayo tras la secreción de decorina y procolágeno - 1 se expresaron con relación a un valor control del vehículo de 100.

### *Resultados*

15 Los resultados mostrados en las tablas 1 y 2 demuestran que los diversos isoalfa ácidos, reducidos y no reducidos estimulan la expresión de decorina y procolágeno - 1.

TABLA 1

*Síntesis de Decorina*

20

	% de síntesis de decorina con relación al control
25 Control	100
Ácidos Rho de lúpulo 100 µg/ml	252
30 Isoalfa ácidos de lúpulo 100 µg/ml	186
Tetrahidro-isoalfa ácidos de lúpulo 100 µg/ml	170

TABLA 2

*Síntesis de Procolágeno - 1*

35

	% de síntesis de decorina con relación al control
40 Control	100
Ácidos Rho de lúpulo µg/ml	178
45 Isoalfa ácidos de lúpulo 1 µg/ml	134
Tetrahidro-isoalfa ácidos de lúpulo 10 µg/ml	201

### 50 Ejemplo 2

*Los isoalfa ácidos de lúpulo actúan de manera sinérgica para inhibir la expresión de la prostaglandina E<sub>2</sub> en fibroblastos de piel en respuesta a estrés*

### 55 *Ensayo de PGE<sub>2</sub> de fibroblastos*

La producción de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) por los fibroblastos de la piel humana se pueden inducir mediante el PMA de estímulo inflamatorio (forbal miristato acetato). PMA representa un agente agresor externo que induce estrés oxidante y respuestas inflamatorias en células. Este modelo se usa para modelar la inflamación *in vivo*.

60

Se sembraron fibroblastos de prepucios humanos neonatales en el segundo pase (P2) en placas de 96 pocillos a 35.000 células/pocillo y se mantuvieron durante 24 horas en una atmósfera de dióxido de carbono al 5% en medio de Tagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal al 10%. Novasoy 40<sup>®</sup> que contenía 20 mM de isoflavonas, genistina, daizina y glicerina (en una relación de 1:1,3:0,3) y 5 mM de isoalfa ácidos de lúpulo, o bien independientemente o en combinación se añadieron a las células (DMEM, suplementado con suero de ternera fetal al 10%) en dimetilsulfóxido (etanol, concentración final 1%) por triplicado y se incubaron durante 24 horas adicionales. Se añadió Forbal miristato acetato (PMA) (Sigma) al medio y las células se incubaron durante 24 horas

65

## ES 2 268 632 T3

adicionales. El control no contenía ningún compuesto de ensayo ni PMA. Los fibroblastos/medio se analizaron después inmediatamente o se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C para análisis futuro. Después las células se contaron y los datos del análisis de transferencia de puntos se normalizaron posteriormente hasta el número de células.

5

Ensayo de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>): se tomaron volúmenes de 50 µl de medio de cultivo para el ensayo de PGE<sub>2</sub> agitando suavemente la placa de cultivo. Los niveles de PGE<sub>2</sub> en el medio se determinaron con un kit de inmunoensayo de PGE<sub>2</sub> Biotrak (Amersham, Reino Unido). El ensayo se basa en la finalización entre PGE<sub>2</sub> no marcada en la muestra y una cantidad fija de PGE<sub>2</sub> marcada con peroxidasa de rábano picante para una cantidad limitada o fija de anticuerpo específica de PGE<sub>2</sub>. Las concentraciones de muestra no marcada de PGE<sub>2</sub> se determinan de acuerdo con una curva patrón, que se obtuvo al mismo tiempo.

10

Cuando los isoalfa ácidos de lúpulo y Novasoy 40 se añaden a las células a concentraciones sub-óptimas (es decir, las concentraciones justo por debajo de las concentraciones que producen regulación hacia abajo máximas de PGE<sub>2</sub>) la regulación hacia abajo de PGE<sub>2</sub> se pueden potenciar cuando los isoalfa ácidos de lúpulo y 5,4 µg/ml de isoflavonas de Novasoy 40 se combinan a una concentración de 300 µM (isoflavonas), respectivamente. Una interacción sinérgica se observó entre Novasoy 40 y los isoalfa ácidos de lúpulo cuando se combinaron a las concentraciones anteriores, como se muestra en la tabla 3:

15

20

TABLA 3

	PEG2 ng/ml	% total de PGE2
Control	1246,1	-
Control + vehículo	1191,6	-
Control + vehículo : PMA	12800,0	100,0
300 µg/ml de isoalfa ácidos	3851,0	30,1
5,4 µg/ml de Novasoy	12800,0	100,0
Isoalfa ácidos (1/1000)/Novasoy 20 µM	1164,5	9,1

25

30

35

### Ejemplo 3

#### *Composición de sopas*

40

3,4 gramos de grasa vegetal }  
 0,5 g de yema de huevo modificada } juntos llamados "creamer"  
 6,0 g de maltodextrina }

45

0,025 gramos de Novasoy 40<sup>®</sup> que contiene 40% en peso de las isoflavonas genistina/daidzina y glicitina en una relación de peso de 1:3 : 1:0,3

50

0,000446 gramos de isoalfa ácidos de lúpulo

0,6 gramos de cuscurros de almidón de maíz

55

16,1 gramos de almidón de patata seca

1,0 gramos de sal

0,3 gramos de sólidos de cebolla

60

0,7 gramos de cebollas

0,2 gramos de perejil y extracto de hierbas

3,2 gramos de agentes aromatizantes

65

El "creamer" y los otros componentes se mezclan en un mezclador. La mezcla obtenida es una sopa instantánea seca que se puede usar para preparar una sopa mezclándola con 200 ml de agua en ebullición con agitación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende isoalfa ácidos de lúpulo y una o más isoflavonas seleccionadas entre seleccionadas entre genisteína, gensitina, daidzeína, daidzina, gliciteína, y glicitina en la que la relación de peso de extracto de isoalfaácidos de lúpulo a isoflavonas está entre 1:50 a 50:1, calculado como aglucón.
- 10 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la relación de peso de isoalfa ácidos de lúpulo a dichas isoflavonas está entre 20:1 a 1:20, calculada como aglucón.
- 15 3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la relación de peso de isoalfa ácidos de lúpulo a dichas isoflavonas está en el intervalo de entre 1:2 a 2:1, calculada como aglucón.
- 20 4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende genisteína/genistina y daidzeína/daidzina presentes en una relación de peso de entre 2:1 a 1:2, calculada como aglucón.
- 25 5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las isoflavonas se derivan de soja.
- 30 6. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones se seleccionan entre isoalfa ácidos no reducidos, dihidroisoalfaácidos y tetrahidro-isoalfa ácidos y las mezclas de los mismos.
- 35 7. Una forma de dosificación que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la forma de dosificación comprende entre 10 mg y 200 mg de dichos isoalfa ácidos de lúpulo y entre 10 mg y 200 mg de dichas isoflavonas.
- 40 8. Un producto alimentario que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 45 9. Un producto alimentario de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la cantidad de dichos isoalfa ácidos de lúpulo y dichas isoflavonas presentes en el producto alimentario está entre 20% y 100% de la ingesta diaria recomendada (= cantidad de RDI) total de los isoalfa ácidos de lúpulo e isoflavonas por ración.
- 50 10. Un producto alimentario de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el producto alimentario se selecciona entre el grupo constituido por pastas, margarinas, cremas, salsas, aliños, mayonesas, helados, cargas, confiterías, barras de salud, cereales y bebidas saludables.
- 55 11. Un producto alimentario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en el que el producto alimentario contiene de 20 mg a 400 mg de una combinación de dichos isoalfa ácidos de lúpulo y dichas isoflavonas, por ración recomendada.
- 60 12. Una composición que comprende una combinación de isoalfa ácidos de lúpulo y una o más isoflavonas seleccionadas entre genisteína, gensitina, daidzeína, daidzina, gliciteína, y glicitina para uso en la promoción de la formación de colágeno y/o decorina en la piel de un animal o ser humano.
- 65 13. Una composición que comprende una combinación de isoalfa ácidos de lúpulo y una o más isoflavonas seleccionadas entre genisteína, gensitina, daidzeína, daidzina, gliciteína, y glicitina para uso en reducción de los efectos de envejecimiento en la piel de un animal o ser humano.
14. Una composición que comprende una combinación de isoalfa ácidos de lúpulo y una o más isoflavonas seleccionadas entre genisteína, gensitina, daidzeína, daidzina, gliciteína, y glicitina para uso en el tratamiento o prevención de los efectos de inflamación en un animal o ser humano.