



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 375**

51 Int. Cl.:
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 15/12 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61P 5/24 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04802152 .1**
96 Fecha de presentación : **15.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1727555**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.12.2006**

54 Título: **Producción de extractos de lúpulo que tienen bioactividad estrógena y antiproliferativa.**

30 Prioridad: **16.12.2003 EP 03447290**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.10.2009

73 Titular/es: **Metagenics Belgium BVBA**
Edward Vlietinckstraat 20
8400 Oostende, BE

72 Inventor/es: **Maes, Francis;**
De Keukeleire, Denis y
Heyerick, Arne

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 326 375 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

Producción de extractos de lúpulo que tienen bioactividad estrógena y antiproliferativa.

5 La presente invención se refiere a un método para la producción de extractos de lúpulo enriquecidos con 8-prenilnaringenina con respecto a 6-prenilnaringenina, de acuerdo con el preámbulo de la primera reivindicación.

10 El lúpulo contiene tres clases principales de metabolitos secundarios, a saber los ácidos de lúpulo, el aceite esencial de lúpulo y los polifenoles de lúpulo. Los ácidos de lúpulo y el aceite esencial de lúpulo y, en cierta medida, los polifenoles de bajo peso molecular, son los componentes más importantes del lúpulo a los efectos de la fermentación de la cerveza. Los extractos de lúpulo con fines de fermentación se preparan, por lo general, por la extracción de los lúpulos o productos del lúpulo con CO₂ líquido o supercrítico, con el fin de obtener extractos de lúpulo que contienen los metabolitos secundarios mencionados anteriormente, en las proporciones deseadas.

15 Recientemente, un importante volumen de investigación se ha centrado en la actividad biológica de los flavonoides prenilados, que constituyen una clase específica de polifenoles. Los flavonoides prenilados más importantes presentes en el lúpulo fresco son las *chalconas*, en particular xantohumol y desmetilxantohumol. Estas chalconas son precursores de *flavanonas* tales como isoxantohumol (que tiene su origen en el xantohumol), 8-prenilnaringenina y 6-prenilnaringenina (ambas procedentes de desmetilxantohumol) (véase la Figura 1). La 8-prenilnaringenina ha sido identificada como el principio activo de la actividad estrogénica del lúpulo, con una actividad mayor que la de otros fitoestrógenos establecidos (Milligan *et al.*, 1999). Además de 8-prenilnaringenina, otros compuestos similares derivados del lúpulo, tales como 6-prenilnaringenina, isoxantohumol, 6,8-diprenilnaringenina y 8-geranilnaringenina (Milligan *et al.*, 2000), han demostrado ser sólo débilmente estrogénicos. Ensayos *in vivo* han confirmado la elevada actividad estrogénica de 8-prenilnaringenina (Milligan *et al.*, 2000).

25 Por otra parte, xantohumol ha demostrado ser un compuesto preventivo del cáncer muy potente *in vitro*, con un espectro extraordinariamente amplio de mecanismos inhibitorios en las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis (Gerhauser *et al.*, 2002). En coincidencia con su potencial anti-iniciación, el xantohumol modula de manera potente la actividad de enzimas que intervienen en el metabolismo carcinógeno y en la detoxificación, por ejemplo, las enzimas CYP450 (Henderson *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2000c), y quinona reductasas (Miranda *et al.*, 30 2000a). Adicionalmente, se ha demostrado que xantohumol es capaz de eliminar especies de oxígeno reactivo que incluyen los radicales hidroxilo y peroxilo (Miranda *et al.*, 2000b; Rodríguez *et al.*, 2001), así como de inhibir el radical aniónico superóxido y la producción de óxido nítrico (Zhao *et al.*, 2003). Como potencial actividad promotora antitumoral, xantohumol demuestra propiedades antiinflamatorias a través de la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa-1 y la ciclooxigenasa-2 (Gerhauser *et al.*, 2002). Los mecanismos antiproliferativos dirigidos a la prevención de la carcinogénesis en la fase de progresión incluyen la inhibición de la síntesis de ADN y la inducción de la detención del ciclo celular en la fase S, apoptosis e inducción de la diferenciación celular (Miranda *et al.*, 1999; Gerhauser *et al.*, 2002). Además, xantohumol ha demostrado ser eficaz a concentraciones nanomolares en la prevención de lesiones preneoplásicas inducidas por carcinógenos en el cultivo de glándulas mamarias de ratón, un modelo que actúa como 40 enlace entre los modelos de carcinogénesis *in vitro* a corto plazo e *in vivo* a largo plazo (Gerhauser *et al.*, 2002).

Los flavonoides anteriormente descritos son productos no esenciales en el procedimiento de fermentación de la cerveza. En su gran mayoría, permanecen en el residuo después de la extracción de los compuestos deseados del lúpulo con CO₂ líquido o supercrítico. En condiciones normales de fermentación, en la que se usa lúpulo entero, 45 productos de lúpulo o fracciones particulares de lúpulo, la concentración total de flavonoides prenilados puede ser de hasta 4 mg por litro de cerveza (Stevens *et al.*, 1999).

En el documento DE 199 39 350 se describe un método para la producción de un extracto de lúpulo enriquecido en xantohumol, según el cual se extrae un producto de lúpulo con un disolvente orgánico o agua alcalina. Antes de esta 50 extracción, el producto de lúpulo se puede extraer con agua para eliminar las sustancias hidrófilas. Como disolvente orgánico apropiado se describe una solución de agua/etanol. Sin embargo, no se menciona nada sobre la presencia de flavanonas preniladas en el extracto de lúpulo.

De acuerdo con el documento WO03014287, la actividad estrogénica de los extractos de lúpulo se debe atribuir, 55 en principio, a la presencia de 8-prenilnaringenina, que ha demostrado ser el compuesto que exhibe la actividad estrogénica más importante. Se informa de que la 6-prenilnaringenina exhibe también actividad estrogénica, aunque menor que la de 8-prenilnaringenina, y de que xantohumol es capaz de interferir en el metabolismo celular y se puede considerar un agente de prevención del cáncer. Se describe que el uso de los extractos de lúpulo del documento WO03014287 es adecuado en la profilaxis o la terapia de estados patológicos causados por una falta de estrógenos o 60 alteraciones del metabolismo de hormonas esteroides sexuales, en especial de estrógenos.

El documento WO03014287 describe igualmente un método para producir un extracto de lúpulo enriquecido con chalconas y flavanonas tales como xantohumol, isoxantohumol, 6-prenilnaringenina y 8-prenilnaringenina. El método comprende las etapas de

65 (1) extraer el lúpulo o un producto de lúpulo con un alcano C₅-C₇ o CO₂ supercrítico para eliminar las sustancias hidrófobas presentes en el lúpulo;

ES 2 326 375 T3

- (2) extraer el residuo obtenido en la etapa (1) con agua, con el fin de eliminar las sustancias hidrófobas contenidas en el lúpulo y, por último
- (3) extraer el residuo obtenido en la etapa (2) con un disolvente orgánico, seleccionado del grupo consistente en alcoholes, alcoholes con base acuosa, cetonas, cetonas con base acuosa, o ésteres, o mezclas de los mismos.

Las concentraciones de isoxantohumul, 6-prenilnaringenina y 8-prenilnaringenina en el extracto de lúpulo obtenido de esta forma han demostrado aumentar con el incremento de la temperatura durante la extracción con agua en la etapa (2). Sin embargo, en todos los ejemplos, la relación ponderal de 8-PN/(8-PN+6-PN) está dentro del intervalo de 18%-25%.

Del extracto de lúpulo descrito en el documento WO02/085393 se afirma que contiene al menos 3% en peso de flavonoides prenilados, en especial xantohumul, isoxantohumul y 8-prenilnaringenina. No obstante, una mayoría de los extractos del documento WO02/085393 no exhibió una actividad estrogénica reforzada en comparación con el extracto tradicional, no enriquecido. Adicionalmente, no se ha demostrado ninguna correlación entre la composición del extracto y la actividad estrogénica. Tampoco se atribuye estrogénicidad a la 8-prenilnaringenina. Se señala, además, que las propiedades estrogénicas del extracto se expresarían de manera particular cuando contuvieran 1-30% en peso de xantohumul, 0,01-50% en peso de isoxantohumul, 0,0005-10% en peso de 8-prenilnaringenina. Se afirma que el extracto de lúpulo del documento WO02/085393 es apropiado para fabricar medicamentos con propiedades estrogénicas, composiciones cosméticas, suplementos nutricionales y preparaciones dietéticas.

Hänsel y Schulz (1988) describen someter desmetilxantohumul y xantohumul, aislados de conos de lúpulo recién cosechados, a isomerización en una solución etanólica de hidróxido de potasio al 5%. Xantohumul isomerizó en isoxantohumul con una recuperación de 80%, en tanto que la isomerización de desmetilxantohumul proporcionó tanto 6-prenilnaringenina como 8-prenilnaringenina, con recuperaciones de 35% y 30%, respectivamente. De esta forma, sería posible obtener una relación de 8-PN/(8-PN+6-PN) de 46%, demostrando que se favorece la formación de una 6-prenilnaringenina termodinámicamente más estable.

De manera alternativa, Milligan *et al.* (2002) describen la preparación de 8-prenilnaringenina a través de la desmetilación de isoxantohumul, aislado tras la isomerización del residuo de un extracto de diclorometano de conos secos de lúpulo en una solución etanólica de hidróxido de potasio al 5%. El procedimiento de desmetilación se llevó a cabo usando tricloruro de boro en una mezcla de acetonitrilo y diclorometano, y demostró tener un rendimiento de sólo 53%.

Una serie de patentes, por ejemplo los documentos US 5.370.897, US 3.839.588 y US 1.246.425, describen someter ácidos alfa a un procedimiento de isomerización alcalina durante la producción de ácidos iso-alfa. Sin embargo, los extractos adecuados para una reacción de isomerización de este tipo se obtienen, en su mayor parte, por extracción con hexano, dióxido de carbono supercrítico o líquido como disolventes de extracción. Dado que tales extractos no contienen xantohumul ni desmetilxantohumul, los extractos isomerizados carecen de las correspondientes flavononas preniladas. Adicionalmente, el documento US 1.274.678 describe que cuando el extracto original que contiene los ácidos alfa se obtiene por extracción con benceno, se demuestra que resulta esencial eliminar los flavonoides prenilados, xantohumul e isoxantohumul, puesto que estas sustancias interfieren con el proceso de producción. De este modo, estos hallazgos sobre la isomerización en medio alcalino carecen de importancia para la presente invención.

Aunque se han desarrollado métodos para enriquecer los extractos de lúpulo en flavonoides prenilados, hasta la fecha no se han encontrado métodos para obtener extractos de lúpulo en los que la 8-prenilnaringenina, altamente estrogénica, esté presente de manera predominante en comparación con su isómero, 6-prenilnaringenina.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es ofrecer un método para la producción de un extracto de lúpulo con un rendimiento optimizado de 8-prenilnaringenina, en particular un método con el que se logre un enriquecimiento predominante en 8-prenilnaringenina, comparada con el isómero 6-prenilnaringenina.

Un objeto adicional de esta invención es proporcionar extractos de lúpulo con composiciones específicas y optimizadas de todos los flavonoides prenilados relevantes, o derivados de los mismos, teniendo en consideración sus actividades biológicas.

Esto se alcanza con la presente invención, por medio de un procedimiento que muestra las especificidades técnicas de la parte caracterizadora de la primera reivindicación.

El método de la presente invención se distingue en que el lúpulo o un producto de lúpulo se someten a (1) una reacción de isomerización en presencia de agua como disolvente, y en presencia de una cantidad de una base, y (2) al menos a una extracción.

En el método de la presente invención, se prefiere utilizar agua como disolvente en la reacción de isomerización.

Se entiende que el lúpulo o el producto de lúpulo comprende cualquier forma de lúpulo procesado, por ejemplo, lúpulo peletizado o cualquier extracto de lúpulo o cualquier residuo derivado del lúpulo que contiene flavonoides prenilados.

5 El inventor ha encontrado ahora que cuando se lleva a cabo la reacción de isomerización en presencia de agua como disolvente, es posible obtener un extracto de lúpulo que está enriquecido de manera adicional en flavonoides prenilados. En especial, con la presente invención se puede obtener un extracto enriquecido en 8-prenilnaringenina (y xantohumol) con respecto a 6-prenilnaringenina, en comparación con el estado de la técnica, en donde el enriquecimiento se manifiesta de manera particular cuando se utiliza exclusivamente agua como disolvente en la reacción
10 de isomerización. Debido al enriquecimiento en 8-prenilnaringenina, se puede obtener un extracto de lúpulo con una actividad estrogénica mayor, en el que -además- la posible actividad proliferativa causada por la presencia de 8-prenilnaringenina resulta contrarrestada por la actividad antiproliferativa de xantohumol (véase la Figura 2). En este sentido, es importante destacar que xantohumol exhibe un espectro excepcionalmente amplio de mecanismos de inhibición en todas las etapas de la carcinogénesis, es decir, iniciación, promoción y progresión (Gerhauser *et al.*, 2002).

15 La secuencia en la que se lleva a cabo la isomerización y la al menos una extracción no es crítica para la invención. En la práctica, esto significa que la isomerización o la al menos una extracción se puede efectuar en primer lugar.

20 *La reacción de isomerización*

Es sabido que a temperaturas elevadas tanto desmetilxantohumol como xantohumol, los flavonoides prenilados (chalconas) más importantes presentes en el lúpulo o un producto de lúpulo, experimentan una fácil isomerización
25 térmica a través de una cicloadición intramolecular tipo Michael en sus correspondientes flavanonas. Mientras que la isomerización de xantohumol conduce de forma casi exclusiva a isoxantohumol, la isomerización de desmetilxantohumol da lugar a la formación de una mezcla de 8-prenilnaringenina (8-PN) y 6-prenilnaringenina (6-PN) en una relación molar de $(8\text{-PN} \times 100\%)/(8\text{-PN} + 6\text{-PN})$ que, habitualmente, se encuentra entre 15% y 25%, debido muy probablemente a la menor estabilidad termodinámica de 8-PN, comparada con 6-PN. Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que cuando la reacción de isomerización se lleva a cabo en presencia de agua y bajo condiciones alcalinas específicas,
30 la relación $(8\text{-PN} \times 100\%)/(8\text{-PN} + 6\text{-PN})$ se desvía a favor de una 8-PN termodinámicamente menos estable, manteniéndose casi inalterado el rendimiento total de $(8\text{-PN} + 6\text{-PN})$. Dado que 8-PN es el compuesto que tiene la mayor actividad estrogénica, comparada con 6-PN o cualquier otro compuesto derivado del lúpulo, la actividad estrogénica del extracto de lúpulo obtenido de este modo puede verse aumentada en 3 a 5 veces en comparación con los extractos de lúpulo conocidos (por ejemplo, extracción hidroalcohólica a temperaturas elevadas). Con el uso de agua como disolvente exclusivo en la reacción de isomerización se ha encontrado un enriquecimiento optimizado en 8-PN.

Una realización preferida del método de la presente invención se distingue porque la reacción de isomerización se lleva a cabo bajo condiciones alcalinas, correspondientes a concentraciones de KOH en agua (% en peso/volumen) de al menos 0,5, preferentemente de al menos 1 y, más preferentemente, de al menos 5.
40

La realización de la reacción de isomerización bajo condiciones alcalinas crecientes permite desviar la relación $(8\text{-PN} \times 100\%)/(8\text{-PN} + 6\text{-PN})$ desde 15-25%, tal como se conoce en el estado de la técnica, a más de 50%, a menudo por encima de 60 y 75% cuando se usa agua como disolvente, o incluso más a favor de 8-PN, mientras que el rendimiento total de $(8\text{-PN} + 6\text{-PN})$ permanece prácticamente invariable. Como resultado, se puede obtener un extracto de lúpulo
45 que está altamente enriquecido en 8-PN. O, dicho con otras palabras, con la presente invención es posible invertir la relación 6-PN/8-PN y, mientras que con las técnicas actualmente vigentes era posible obtener un enriquecimiento selectivo en 6-PN, la presente invención ofrece un enriquecimiento selectivo en 8-PN, que es el compuesto con mayor actividad estrogénica. Bajo las condiciones de reacción usadas en el método de la presente invención, hasta aproximadamente 95% del xantohumol presente en el producto de lúpulo que se hace reaccionar puede isomerizar en isoxantohumol. Se ha observado que el proceso de isomerización puede ocurrir también de esta forma con extractos en los que se ha convertido previamente desmetilxantohumol en una determinada relación de $(8\text{-PN} \times 100\%)/(8\text{-PN} + 6\text{-PN})$.
50

Se señala que en la técnica conocida, la isomerización de chalconas en sus correspondientes flavanonas se lleva a cabo, habitualmente, en una solución etanólica de hidróxido de potasio al 5% (por ejemplo, Hänsel y Schulz, 1988)
55 bajo condiciones de reflujo durante 30 minutos, dando una relación $(8\text{-PN} \times 100\%)/(8\text{-PN} + 6\text{-PN})$ de 40-46%. No obstante, con la presente invención, el enriquecimiento en 8-PN termodinámicamente menos estable se ha podido aumentar significativamente mediante la realización de la reacción de isomerización en agua, en especial a temperatura ambiente.

60 Para minimizar el riesgo de oxidación de los reactantes o de los productos de reacción, la reacción de isomerización se lleva a cabo, preferentemente, en atmósfera inerte. Los reactantes, en especial xantohumol y desmetilxantohumol, así como los productos de reacción isoxantohumol y 8-prenilnaringenina, contienen dobles enlaces y grupos fenólicos, que son susceptibles de oxidación.

65 La temperatura a la que se lleva a cabo la reacción de isomerización no es crítica para la invención y puede ser cualquier temperatura situada entre el punto de congelación y el punto de ebullición de la mezcla de reacción. De forma muy especialmente apropiada, la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente, si bien las temperaturas entre 40 y 60°C, en particular de aproximadamente 50°C, se consideran también adecuadas.

ES 2 326 375 T3

Los inventores han encontrado, además, que la reacción de isomerización se produce a una elevada velocidad de reacción y puede completarse prácticamente en menos de 15 minutos, incluso a temperatura ambiente. Resulta preferible llevar a cabo la reacción de isomerización durante un período de tiempo de entre 0,25 y 4 h con el fin de favorecer la producción de 8-prenilnaringenina. El experto en la técnica será capaz, en general, de ajustar la duración y la temperatura a la que se efectúa la reacción de isomerización para obtener una conversión y selectividad óptimas hacia los productos finales deseados y minimizar el riesgo de formación de productos secundarios no deseados, lo que podría ocurrir si la reacción de polimerización se mantiene durante un período de tiempo demasiado prolongado.

10 *El proceso de extracción*

Para aislar los compuestos deseados del lúpulo o del producto del lúpulo, ya sea antes o después de haber finalizado la reacción de isomerización, el lúpulo o el producto de lúpulo se someten al menos a una extracción.

15 La extracción de los flavonoides prenilados se obtiene sometiendo el lúpulo o el producto de lúpulo a una extracción con al menos un disolvente orgánico, seleccionado del grupo de alcoholes, alcoholes con base acuosa, cetonas, cetonas con base acuosa o ésteres, o mezclas de los mismos, o agua alcalina. Ejemplos de disolventes orgánicos apropiados para su uso son los disolventes de polaridad media, por ejemplo, acetato etílico o acetona, o de alta polaridad, por ejemplo, etanol o metanol, o mezclas de los mismos consistentes en 90/10 (en volumen) de acetato etílico/metanol o una mezcla hidroalcohólica (75/25 (en volumen) de etanol/agua).

Preferentemente, antes o después de someter el lúpulo o el producto de lúpulo a la al menos una extracción, o antes o después de someter el lúpulo o el producto de lúpulo a la reacción de isomerización, el lúpulo o el producto de lúpulo se someten a una etapa de extracción adicional con agua y/o al menos un disolvente orgánico apolar, seguida de la recuperación del residuo o del extracto enriquecido en flavonoides prenilados. La extracción adicional con agua se efectúa con el propósito de obtener un mayor enriquecimiento en flavonoides prenilados en el extracto de lúpulo enriquecido, mediante la mayor eliminación posible de cualquier material de carga hidrófilo funcional presente en el extracto enriquecido. Ejemplos de tales materiales de carga no funcionales incluyen proteínas. Una extracción adicional con al menos un disolvente orgánico apolar permite reducir el contenido del material de carga hidrófobo (lipófilo) no funcional, lo que conduce a un mayor enriquecimiento o concentración adicional de flavonoides prenilados en el extracto enriquecido en flavonoides prenilados.

En caso que la concentración de material de carga hidrófobo en el material de partida del lúpulo o el producto de lúpulo, que se deben someter a la reacción de isomerización y extracción, sea excesivamente alta, puede considerarse una extracción adicional con al menos un disolvente orgánico apolar. El producto sometido a una extracción adicional de este tipo será, principalmente, el residuo de lúpulo que permanece después de la extracción primaria del lúpulo con CO₂ líquido o supercrítico, realizada bajo condiciones no exhaustivas (temperatura y presión moderadas), para separar los compuestos de interés para la fermentación de la cerveza del residuo que contiene metabolitos secundarios más polares, incluidos los flavonoides prenilados importantes.

La extracción de material de carga hidrófilo e hidrófobo se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento de extracción apropiado conocido por el experto en la técnica. Procedimientos de extracción adecuados incluyen extracciones disolvente-disolvente (por ejemplo, agua frente a acetato etílico, hexano frente a mezclas hidroalcohólicas), o extracciones de fase sólida (solubilización del material hidrófilo e hidrófobo en agua y un disolvente orgánico apolar, respectivamente, o uso de sílice o sílice derivatizada). La separación de la fracción con flavonoides prenilados después de las extracciones con agua y el disolvente orgánico apolar, respectivamente, se puede llevar a cabo, por ejemplo, por medio de decantación, filtración y/o centrifugación.

Un método de extracción posible, por ejemplo, comprende extraer el lúpulo con CO₂ líquido o supercrítico y recuperar el residuo obtenido, seguido por someter el residuo a la reacción de isomerización bajo condiciones alcalinas. Subsiguientemente, la mezcla de reacción que contiene el lúpulo consumido por ebullición se acidifica hasta pH neutro y se recupera el residuo, por ejemplo por filtración o centrifugación, después de lavar con agua. A continuación, se pueden extraer selectivamente los flavonoides prenilados del residuo, utilizando disolventes adecuados o sus mezclas.

55 *Pre-procesamiento*

Con el objeto de mejorar la viabilidad económica de la presente invención y concentrar adicionalmente los compuestos deseados, antes de someterlo a la reacción de isomerización y extracción combinadas, el lúpulo o producto de lúpulo se someten a una extracción en CO₂ líquido o supercrítico o, al menos, un disolvente orgánico sustancialmente apolar, seguida de la recuperación del residuo que contiene los flavonoides prenilados.

De hecho, esto significa que se recupera el extracto de interés para los fines de fermentación, mientras el residuo se enriquece en flavonoides prenilados y se le priva de la mayor parte del material de carga hidrófobo por la pre-extracción. Este residuo pre-enriquecido se somete, entonces, a la isomerización y a la al menos una extracción en orden arbitrario.

Otra posibilidad incluye el uso de extracción con CO₂ líquido o supercrítico de un extracto etanólico denominado “extracto puro de resina”, que se mezcla con un vehículo (por ejemplo, tierra de diatomeas), y la recuperación del residuo en el vehículo. Este residuo que contiene los flavonoides prenilados se puede someter, entonces, a la isomerización y a la al menos una extracción en cualquier orden.

5

Formulación apropiada

Los inventores han encontrado que es posible inhibir o, incluso, contrarrestar una posible proliferación del extracto de lúpulo enriquecido de la presente invención, inducida por la actividad estrogénica de 8-prenilnaringenina, por medio de la presencia de una cantidad de xantohumol en el extracto enriquecido, puesto que se ha observado que xantohumol exhibe actividad antiproliferativa. Sin embargo, los inventores han encontrado que dicha inhibición sólo se puede obtener con la condición de que la relación ponderal de xantohumol a 8-prenilnaringenina sea suficientemente alta. De manera particular, los inventores han observado suficiente inhibición con una relación ponderal de xantohumol a 8-prenilnaringenina de al menos 10, preferentemente al menos 30. Esta relación se puede obtener agregando un exceso de xantohumol al extracto enriquecido (véase la Figura 2). En otras palabras, a relaciones ponderales determinadas de xantohumol a 8-prenilnaringenina, se puede obtener una inhibición eficaz de la actividad proliferativa asociada con la estrogenicidad de 8-prenilnaringenina mediante la actividad antiproliferativa de xantohumol.

En este sentido, la Figura 2 demuestra que concentraciones crecientes de 8-prenilnaringenina conducen a un aumento de la proliferación de las células del cáncer de mama MCF-7. Sorprendentemente, los inventores han encontrado que para cada concentración de 8-prenilnaringenina, las concentraciones bajas de xantohumol ($< 1 \mu\text{M}$) estimulan la proliferación inducida por 8-prenilnaringenina, en particular aquellas concentraciones a las que la relación de xantohumol con respecto a 8-prenilnaringenina es inferior a 10, mientras que las concentraciones más elevadas de xantohumol, de al menos $5 \mu\text{M}$, han demostrado inhibir de forma significativa la proliferación inducida por 8-prenilnaringenina.

Desgraciadamente, bajo las condiciones de reacción que proporcionan la isomerización más eficaz de desmetil-xantohumol en 8-prenilnaringenina y 6-prenilnaringenina y que favorecen simultáneamente la formación de 8-prenilnaringenina, xantohumol experimenta una isomerización casi cuantitativa en isoxantohumol. Por otra parte, es posible producir un extracto de lúpulo enriquecido en xantohumol sometiendo el lúpulo o un producto de lúpulo al menos a una extracción bajo condiciones no isomerizantes (extracción bajo condiciones neutras o ácidas a temperatura ambiente). Por lo tanto, el método de la presente invención comprende, preferentemente, una etapa de mezclar el extracto, obtenido por el método anteriormente descrito de un procedimiento combinado de isomerización-extracción, con un segundo extracto de lúpulo enriquecido en xantohumol. De esta forma, se puede obtener un extracto de lúpulo que contiene tanto xantohumol como 8-prenilnaringenina en una relación ponderal específica. Es preferible que la relación ponderal de xantohumol a 8-prenilnaringenina sea de al menos 10, más preferentemente de al menos 30, puesto que dentro de estos intervalos se puede obtener una mezcla que exhibe una combinación apropiada de actividad estrogénica, debida a la presencia de 8-prenilnaringenina, y actividad quimiopreventiva del cáncer, debida a la presencia de xantohumol. Esta combinación permite compensar, por consiguiente, cualquier descenso del contenido en xantohumol del material de partida tras la al menos una reacción de isomerización, debida a la isomerización de xantohumol en isoxantohumol. A través de la mezcla de un extracto enriquecido en 8-prenilnaringenina, obtenido de la extracción-isomerización combinada de esta invención, con un extracto enriquecido en xantohumol, la presente invención permite obtener un extracto de lúpulo con una relación ponderal específica de 8-prenilnaringenina a xantohumol independiente del grado de conversión de xantohumol en isoxantohumol en la reacción de isomerización.

De este modo, con la presente invención se puede obtener un extracto de lúpulo que contiene al menos 0,15% en peso de 8-prenilnaringenina y al menos 3% en peso de xantohumol, más preferentemente al menos 0,33% en peso de 8-prenilnaringenina y al menos 10% en peso de xantohumol.

50

Un método apropiado para obtener el extracto enriquecido en xantohumol comprende las etapas de someter el lúpulo o el producto de lúpulo al menos a una extracción mediante CO₂ líquido o supercrítico o, al menos, un disolvente orgánico sustancialmente apolar, seguida de la recuperación del residuo enriquecido en xantohumol, y someter el residuo al menos a una extracción adicional con disolventes apropiados o mezclas de los mismos, al objeto de incrementar más la concentración de xantohumol.

55

De manera alternativa, la extracción con CO₂ líquido o supercrítico de un denominado “extracto puro de resina” etanólico, que se mezcla con un vehículo (por ejemplo, tierra de diatomeas) da lugar a un residuo en el vehículo enriquecido en flavonoides prenilados. Este residuo se podría someter, entonces, al menos a una extracción con disolventes apropiados o mezclas de los mismos.

60

Incremento del potencial estrogénico

En una realización preferida adicional del método para la producción de un extracto de lúpulo según la presente invención, el método comprende, adicionalmente, las etapas de mezclar el extracto obtenido por la al menos una extracción y la reacción de isomerización, con una cantidad de un extracto enriquecido en un compuesto que posee una elevada actividad estrogénica tal como una 8-alquil-naringenina, preferentemente 8-isopentil-naringenina, que es

ES 2 326 375 T3

8-prenilnaringenina hidrogenada. El motivo de agregar 8-isopentil-naringenina es que los inventores han encontrado, de manera sorprendente, que 8-isopentil-naringenina exhibe actividad estrogénica y que la actividad estrogénica es sólo 3-4 veces más débil que la actividad estrogénica de 8-prenilnaringenina (véase la Figura 4). Con respecto a la 8-isopentil-naringenina, se señala que, aun cuando su actividad estrogénica ha demostrado ser 3-4 veces más débil que la de 8-prenilnaringenina, la 8-isopentil-naringenina ha demostrado exhibir una biodisponibilidad mayor y mejor estabilidad comparada con 8-prenilnaringenina, dado que se metaboliza con menor facilidad. Muy probablemente, este hecho se puede atribuir a la ausencia del doble enlace en la cadena lateral.

La obtención de un extracto enriquecido en 8-isopentil-naringenina se puede realizar usando varios métodos.

Un primer método posible incluye las etapas de:

- a. someter un extracto de lúpulo enriquecido en xantohumol a una reacción de isomerización, para convertir xantohumol en isoxantohumol;
- b. someter el extracto obtenido en la etapa (a) a una reacción de hidrogenación catalítica para convertir isoxantohumol en dihidro-isoxantohumol. La hidrogenación catalítica se lleva a cabo, preferentemente, con la admisión de H₂ en presencia de un catalizador de hidrógeno tal como Pt o Pd soportado, o cualquier otro catalizador. Un ejemplo de vehículo adecuado es carbón activado. La reacción de hidrogenación se lleva a cabo, preferentemente, en MeOH;
- c. someter el producto de reacción de la etapa (b) a una reacción de desmetilación. Esto se efectúa para convertir el dihidro-isoxantohumol en 8-isopentil-naringenina. La reacción de desmetilación se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando tribromuro de boro o cualquier otro agente de desmetilación.

De esta forma, con el método anteriormente descrito es posible convertir el xantohumol estrogénicamente inactivo en un compuesto que posee una elevada actividad estrogénica, a saber, 8-isopentil-naringenina. Se trata de una ventaja importante, puesto que la concentración de xantohumol en el lúpulo es significativamente mayor (0,3-1,2% en peso) que la de desmetilxantohumol (0,005-0,2% en peso), el precursor de 8-prenilnaringenina. Con el método descrito anteriormente, se puede obtener un extracto de lúpulo que no sólo está enriquecido en 8-PN, sino también en 8-isopentil-naringenina, como consecuencia de lo cual es posible incrementar significativamente la actividad estrogénica.

Un segundo método posible de obtener un extracto que contiene 8-isopentil-naringenina consiste en la adición de este producto, obtenido por vía sintética. Aunque la sustitución de la posición 8 tiene lugar habitualmente con baja selectividad y rendimiento, debido al gran número de etapas que intervienen, los inventores han desarrollado ahora un método para la síntesis de 8-isopentil-naringenina que comprende sólo un número limitado de etapas de reacción, con un elevado rendimiento.

De acuerdo con este método, se somete 2,4,6-trimetoxi-benzaldehído (véase la Figura 3) a una reacción de alquilación en presencia de un reactivo órgano-metálico (por ejemplo, isopentil-litio), seguida de desoxigenación a 1-alquil-2,4,6-trimetoxi-bencenos (por ejemplo, 1-isopentil-2,4,6-trimetoxibenceno). La desoxigenación se lleva a cabo, preferentemente, en presencia de trietilsilano en ácido trifluoroacético. Se somete 1-alquil-2,4,6-trimetoxibenceno a una reacción de acetilación, seguida de desmetilación, para proporcionar 3-alquil-2,4,6-trihidroxiacetofenonas (por ejemplo, 3-isopentil-2,4,6-trihidroxiacetofenona). La reacción de acetilación se lleva a cabo, preferentemente, en presencia de cloruro de acetilo y tetracloruro de estaño. La desmetilación se lleva a cabo, preferentemente, en presencia de tribromuro de boro.

En el transcurso de esta vía de síntesis, se prefiere proteger selectivamente dos grupos fenólicos tales como éteres metoximetilo (MOM). Se ha observado que el tercer grupo fenólico resiste la reacción debido a su fuerte fijación intramolecular al hidrógeno.

El producto de la reacción de desmetilación obtenido de esta forma se somete a una reacción de aldol mixta en la que interviene benzaldehído protegido con MOM, para dar la formación de chalconas, que sufren una cicloadición intramolecular tipo Michael en las correspondientes flavanonas. Mediante la eliminación de los grupos protectores en ambiente ácido se obtienen 8-alquil-naringeninas (por ejemplo, 8-isopentil-naringenina).

La presente invención se refiere, asimismo, a un extracto de lúpulo como tal, que comprende una mezcla de 8-prenilnaringenina y 6-prenilnaringenina, en donde la relación de (8-prenilnaringenina x 100%)/(8-prenilnaringenina + 6-prenilnaringenina) es de al menos 50%, preferentemente de al menos 60% y, más preferentemente, de al menos 75%. De este modo, el extracto de lúpulo comprende, preferentemente, una cantidad de xantohumol tal que la relación ponderal de xantohumol a 8-prenilnaringenina es de al menos 10, preferentemente de al menos 20 y, más preferentemente, de al menos 30. Se prefiere que el extracto de lúpulo comprenda al menos 0,15% (en peso), preferentemente al menos 0,33% de 8-prenilnaringenina y al menos 3%, preferentemente al menos 10% (en peso) de xantohumol. De forma muy especialmente preferida, el extracto de lúpulo comprende, adicionalmente, una cantidad de isoxantohumol así como una cantidad de 8-alquil-naringenina, preferentemente 8-isopentil-naringenina.

Indicaciones

El extracto de lúpulo de la presente invención o el extracto de lúpulo obtenible con los métodos de la presente invención se puede utilizar para la fabricación de un medicamento o un producto fitofarmacéutico dotado de actividades estrogénicas y quimiopreventivas contra el cáncer combinadas, en el que la posible actividad proliferativa causada por la presencia del fitoestrógeno 8-prenilnaringenina se contrarresta con la actividad antiproliferativa de xantohumol. Además, el extracto de lúpulo de la presente invención o el extracto de lúpulo obtenible con el método de la presente invención se puede usar para fabricar un medicamento o un producto fitofarmacéutico para el tratamiento o la profilaxis de trastornos o síntomas o molestias o estados patológicos causados por alteraciones del equilibrio hormonal de carácter estrogénico.

Preferentemente, el trastorno o síntoma o molestia o estado patológico causado por la alteración del equilibrio hormonal de carácter estrogénico está relacionado con la menopausia (incluida la perimenopausia). Por lo tanto, y preferentemente, el estado patológico es osteoporosis. En otra realización preferida, la enfermedad se selecciona del grupo consistente en cánceres dependientes de las hormonas sexuales, enfermedades cardiovasculares, disfunción de la próstata y cáncer de colon.

La invención se refiere también a una composición/suplemento nutricional que comprende el extracto de lúpulo de la presente invención.

Adicionalmente, la invención se refiere a una composición cosmética que comprende el extracto de lúpulo de la presente invención.

Los extractos de lúpulo resultantes de la presente invención pueden ser incorporados a diversas formulaciones, incluidas píldoras, cápsulas, grageas, soluciones y similares, en tanto que se pueden aplicar los excipientes habituales para su mejor uso y biodisponibilidad.

En las reivindicaciones secundarias se definen realizaciones preferidas adicionales.

Ejemplos y Figuras

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos y figuras.

Ejemplo 1

Extracción

El lúpulo consumido (variedad de lúpulo Nugget: 202,74 g), es decir, el residuo remanente tras la extracción del lúpulo natural con CO₂ líquido o supercrítico, se extrajo por maceración a temperatura ambiente con 1 l de una mezcla disolvente 90/10 (en volumen) de acetato etílico y metanol, con el fin de extraer selectivamente xantohumol y desmetilxantohumol del lúpulo consumido. El extracto se filtró y se recuperó el extracto enriquecido en xantohumol y desmetilxantohumol (720 ml). Después de evaporar el disolvente bajo presión reducida, el residuo se disolvió nuevamente en 100 ml de una mezcla 1/1 (en volumen) de hexano/metanol, con el objetivo de extraer el material de carga lipófilo, y se transfirió a un embudo de separación. Tras la adición de 30 ml de agua acidificada (HCl 1N), se descartó la capa de hexano que contuvo el material de carga lipófilo. La capa metanólica remanente se sometió a presión reducida para evaporar el disolvente. Tras la adición de agua (70 ml) y acetato etílico (100 ml), y después de la separación de fases, se secó la capa orgánica que contuvo el extracto de lúpulo final.

Rendimientos:

• Extracto de lúpulo final	4,64 g (2,3%)
• Desmetilxantohumol	2,41% en peso
<i>(medido por HPLC)</i>	
• Xantohumol	33,62% en peso
<i>(medido por HPLC)</i>	

ES 2 326 375 T3

Ejemplo 2

Isomerización

5 0,5 g del extracto de lúpulo obtenido en el Ejemplo 1 se agitaron durante 1 h en agua (40 ml) que contuvo cantidades variables de KOH (0 g, 0,2 g, 0,4 g y 2 g, respectivamente). Subsiguientemente, la solución se acidificó a pH = 4-5 usando HCl 6N. El extracto se recuperó por extracción con acetato etílico y, después de retirar el disolvente, se secó. Los resultados de los análisis de HPLC cuantitativa se muestran en la Tabla 1. Se debe destacar que el extracto resultante de agitar sin la adición de una base, contiene 8-prenilnaringenina y 6-prenilnaringenina en una
10 relación muy similar a la de los extractos de lúpulo disponibles en el comercio, mientras que la adición de cantidades crecientes de una base aumentó significativamente la relación (8-prenilnaringenina x 100%)/(8-prenilnaringenina + 6-prenilnaringenina) a favor de 8-prenilnaringenina.

15

TABLA 1

Relación de (8-prenilnaringenina x 100%)/(8-prenilnaringenina + 6-prenilnaringenina) bajo condiciones alcalinas variables

20

KOH (% en p/v)	Relación (%)
0	22,4
0,5	34,7
1	58,6
5	74,8

25

30

Ejemplo 3

Un extracto de lúpulo que contuvo 8-prenilnaringenina y 6-prenilnaringenina se sometió a una reacción de isomerización en hidróxido de potasio acuoso al 5% a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los resultados de los análisis de HPLC cuantitativa se muestran en la Tabla 2. Tal como se puede ver en la Tabla 2, la relación (8-prenilnaringenina x 100%)/(8-prenilnaringenina + 6-prenilnaringenina) aumentó desde 23% en el extracto original a 73% tras la isomerización, a favor de 8-prenilnaringenina.

35

40

Ejemplo comparativo A

Se repitió la reacción de isomerización del Ejemplo 3, con la excepción de que en lugar de hidróxido de potasio acuoso al 5% se utilizó hidróxido de potasio etanólico al 5%. Los resultados de los análisis de HPLC cuantitativa, que se muestran en la Tabla 2, demuestran que se pudo obtener un extracto con una relación (8-prenilnaringenina x 100%)/(8-prenilnaringenina + 6-prenilnaringenina) que aumentó desde 23% en el extracto original a sólo 43% en el producto isomerizado.

45

TABLA 2

50

Composición de un extracto de lúpulo antes y después de la isomerización en diferentes disolventes

55

Composición (en % en peso)	Extracto antes de la isomerización	Extracto tras la isomerización en KOH al 5% en etanol	Extracto tras la isomerización en KOH al 5% en agua
8-prenilnaringenina (8-PN)	0,17	0,31	0,52
6-prenilnaringenina (6-PN)	0,58	0,41	0,19
Relación (8-PNx100%)/(8-PN+6-PN)	23%	43%	73%
Isoxantohumol	0,60	2,37	14,29
Xantohumol	14,42	12,62	0,79

60

65

Formulación apropiada

Figura 2 muestra el estímulo de crecimiento de las células del cáncer de mama MCF-7 por parte de 8-prenilnaringenina y la inhibición de esta proliferación en presencia de concentraciones crecientes de xantohumol.

Se desarrolló un bioensayo para estudiar la proliferación de células cancerosas dependientes del estrógeno por parte de 8-prenilnaringenina y para determinar las concentraciones de xantohumol necesarias para inhibir esta proliferación inducida por 8-prenilnaringenina. A tal efecto, se cultivaron células de cáncer de mama MCF-7 que responden al estrógeno en placas de 96 pocillos, en presencia de una concentración fija y estimulante del crecimiento de 8-prenilnaringenina y concentraciones variables de xantohumol. Para cada concentración de 8-prenilnaringenina (1 nM, 10 nM y 100 nM), las concentraciones de xantohumol fueron 0 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 25 μ M, respectivamente.

Aumento del potencial estrogénico

Figura 4 muestra las curvas de respuesta a la dosis para la actividad estrogénica de 17 β -estradiol (E2), 8-prenilnaringenina (8-PN), 8-isopentil-naringenina (8-PN-H2), y del intermedio dihidro-isoxantohumol (IsoX-H2), medidas con una pantalla de levadura inducible por estrógenos (*Saccharomyces cerevisiae*) que expresa el receptor de estrógeno humano y que contiene plasmidios de expresión portadores de secuencias que responden al estrógeno, responsables de controlar el gen informador Lac-Z (Milligan *et al.*, 2001). Las levaduras se cultivaron en un medio que contuvo concentraciones crecientes de 17 β -estradiol (control positivo), 8-prenilnaringenina (8-PN), 8-isopentil-naringenina (8-PN-H2) o dihidro-isoxantohumol (IsoX-H2). La expresión del gen informador Lac-Z se midió y cuantificó por espectrofotometría.

ES 2 326 375 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir un extracto de lúpulo enriquecido en 8-prenilnaringenina con respecto a 6-prenilnaringenina, **caracterizado** porque el método comprende las etapas de someter el lúpulo o un producto de lúpulo a (1) una reacción de isomerización en presencia de agua como disolvente, y en presencia de una cantidad de una base, y (2) al menos a una extracción.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la reacción de isomerización se lleva a cabo usando agua como disolvente.
- 15 3. El método según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la reacción de isomerización se lleva a cabo bajo condiciones alcalinas correspondientes a concentraciones de KOH (% en peso/volumen) de al menos 0,1, preferentemente al menos 0,5, más preferentemente de al menos 1 y, de forma muy especialmente preferida, de al menos 5.
- 20 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque, antes de someter el lúpulo o un producto de lúpulo a la al menos una extracción y a la reacción de isomerización, el lúpulo o el producto de lúpulo se someten a una extracción en presencia de CO₂ líquido o supercrítico o, al menos, un disolvente orgánico sustancialmente apolar, seguida de la recuperación del residuo que contiene el extracto enriquecido en flavonoides prenilados.
- 25 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el método comprende, adicionalmente, mezclar una cantidad del extracto de lúpulo obtenido por al menos una extracción y la reacción de isomerización, con una cantidad de un extracto de lúpulo enriquecido en xantohumol.
- 30 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la reacción de isomerización y la al menos una extracción continúan hasta obtener un extracto que contiene al menos 0,15% en peso, preferentemente al menos 0,33% en peso de 8-prenilnaringenina, y al menos 3% en peso, preferentemente al menos 10% en peso de xantohumol.
- 35 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque la reacción de isomerización y la al menos una extracción continúan hasta obtener un extracto con una relación de xantohumol/8-prenilnaringenina de al menos 10, preferentemente al menos 30.
- 40 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la reacción de isomerización y la al menos una extracción continúan hasta obtener un extracto que contiene 6-prenilnaringenina y 8-prenilnaringenina en una relación $(8\text{-prenilnaringenina} \times 100\%) / (8\text{-prenilnaringenina} + 6\text{-prenilnaringenina})$ de al menos 50%, preferentemente al menos 60% y, más preferentemente, de al menos 75%.
- 45 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque se utiliza como producto de lúpulo un producto de lúpulo que ha sido sometido a una etapa de extracción adicional con agua y/o al menos un disolvente orgánico apolar, seguida de la recuperación del residuo que contiene el extracto enriquecido en flavonoides prenilados.
- 50 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque la al menos una extracción se lleva a cabo con al menos un disolvente orgánico, seleccionado del grupo de alcoholes, alcoholes con base acuosa, cetonas, cetonas con base acuosa, o ésteres, o mezclas de los mismos, o agua alcalina.
- 55 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque la reacción de isomerización se lleva a cabo a una temperatura entre el punto de congelación y la temperatura de ebullición de la mezcla de reacción, preferentemente a temperatura ambiente.
- 60 12. El método según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la reacción de isomerización se lleva a cabo a una temperatura entre la temperatura ambiente y 60°C, preferentemente a una temperatura aproximada a la temperatura ambiente.
- 65 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque la reacción de isomerización se lleva a cabo en una atmósfera inerte.
14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque la reacción de isomerización se lleva a cabo durante un período de tiempo de entre 0,25 y 4 h.
15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado** porque el método comprende, adicionalmente, la etapa de mezclar una cantidad del extracto de lúpulo enriquecido, obtenido de la al menos una extracción y la reacción de isomerización, con una cantidad de un extracto de lúpulo enriquecido en una 8-alkilnaringenina, preferentemente 8-isopentil-naringenina.

ES 2 326 375 T3

16. El método según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el extracto de lúpulo enriquecido en 8-isopentil-naringenina, se obtiene con un método que comprende las etapas de:

5 (a) someter un extracto de lúpulo enriquecido en xantohumol a una reacción de isomerización, para convertir xantohumol en isoxantohumol;

(b) someter el extracto obtenido en la etapa (a) a una reacción de hidrogenación catalítica, para convertir isoxantohumol en dihidro-isoxantohumol;

10 (c) someter el extracto obtenido en la etapa (b) a una reacción de desmetilación, para convertir dihidro-isoxantohumol en 8-isopentil-naringenina.

17. El método según la reivindicación 16, **caracterizado** porque la reacción de isomerización en la etapa (a) se lleva a cabo bajo condiciones alcalinas.

18. El método según las reivindicaciones 15 a 17, **caracterizado** porque el extracto de lúpulo enriquecido en 8-alquil-naringenina se obtiene por la adición de una cantidad de 8-alquil-naringenina sintética, preferentemente una cantidad de 8-isopentil-naringenina sintética.

20 19. Un extracto de lúpulo que comprende una mezcla de 8-prenilnaringenina y 6-prenilnaringenina, en la que la relación de $(8\text{-prenilnaringenina} \times 100\%) / (8\text{-prenilnaringenina} + 6\text{-prenilnaringenina})$ es de al menos 50%, preferentemente al menos 60% y, más preferentemente, de al menos 75%.

25 20. Un extracto de lúpulo según la reivindicación 19, **caracterizado** porque el extracto comprende una mezcla de xantohumol y 8-prenilnaringenina, en donde la relación ponderal de xantohumol a 8-prenilnaringenina es de al menos 10, preferentemente al menos 20 y, más preferentemente, de al menos 30.

30 21. Un extracto de lúpulo según la reivindicación 19 ó 20, **caracterizado** porque el extracto de lúpulo comprende al menos 0,15% (en peso), preferentemente al menos 0,33% de 8-prenilnaringenina y al menos 3%, preferentemente al menos 10% (en peso) de xantohumol.

22. Un extracto de lúpulo según una de las reivindicaciones 19 a 21, **caracterizado** porque el extracto de lúpulo comprende, adicionalmente, isoxantohumol.

35 23. Un extracto de lúpulo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, **caracterizado** porque el extracto de lúpulo comprende, adicionalmente, una cantidad de 8-alquil-naringenina, preferentemente 8-isopentil-naringenina.

40 24. Uso del extracto de lúpulo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, o del extracto de lúpulo obtenible según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para fabricar un medicamento o un producto fitofarmacéutico en el que la posible actividad proliferativa, debida a la actividad estrogénica de 8-prenilnaringenina, queda inhibida (o contrarrestada) por la actividad antiproliferativa de xantohumol.

45 25. Uso del extracto de lúpulo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, o del extracto de lúpulo obtenible por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para fabricar un medicamento o un producto fitofarmacéutico para el tratamiento o la profilaxis de uno cualquiera de los trastornos, síntomas, molestias o estados patológicos, o una combinación de los mismos, causados por una alteración del equilibrio hormonal de carácter estrogénico.

50 26. Uso según la reivindicación 25, en el que el trastorno, síntoma, molestia o estado patológico causado por la alteración del equilibrio hormonal de carácter estrogénico es la menopausia.

27. Uso del extracto de lúpulo según la reivindicación 25, en el que el estado patológico es osteoporosis.

55 28. Uso del extracto de lúpulo según la reivindicación 25, en el que el estado patológico se selecciona del grupo consistente en cánceres dependientes de las hormonas sexuales, enfermedades cardiovasculares, disfunción de la próstata, cáncer de colon.

60 29. Una composición/suplemento nutricional que comprende una cantidad del extracto de lúpulo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23.

30. Una composición cosmética que comprende una cantidad del extracto de lúpulo según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23.

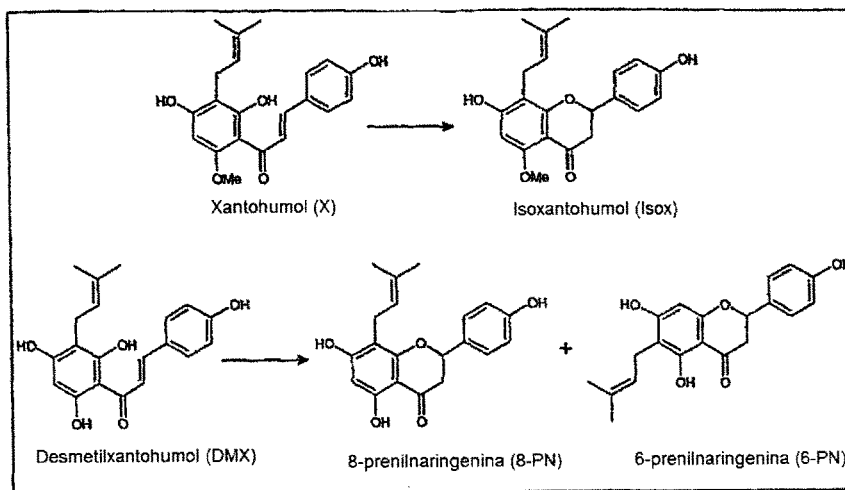


Figura 1. Principales flavonoides prenilados en el lúpulo (*Humulus lupulus L.*)

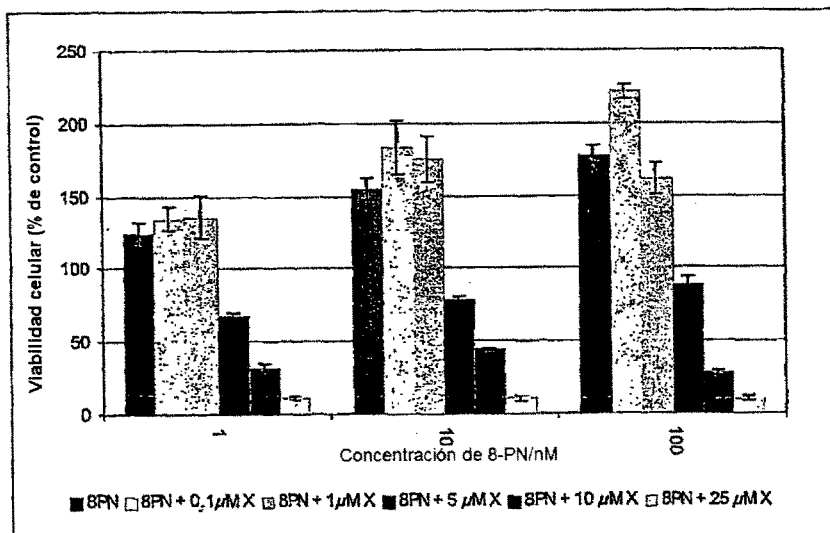


Figura 2. Proliferación de células MCF-7 de cáncer de mama, estimulada por 8-prenilnaringenina, e inhibición de la proliferación en presencia de concentraciones crecientes de xanthumol.

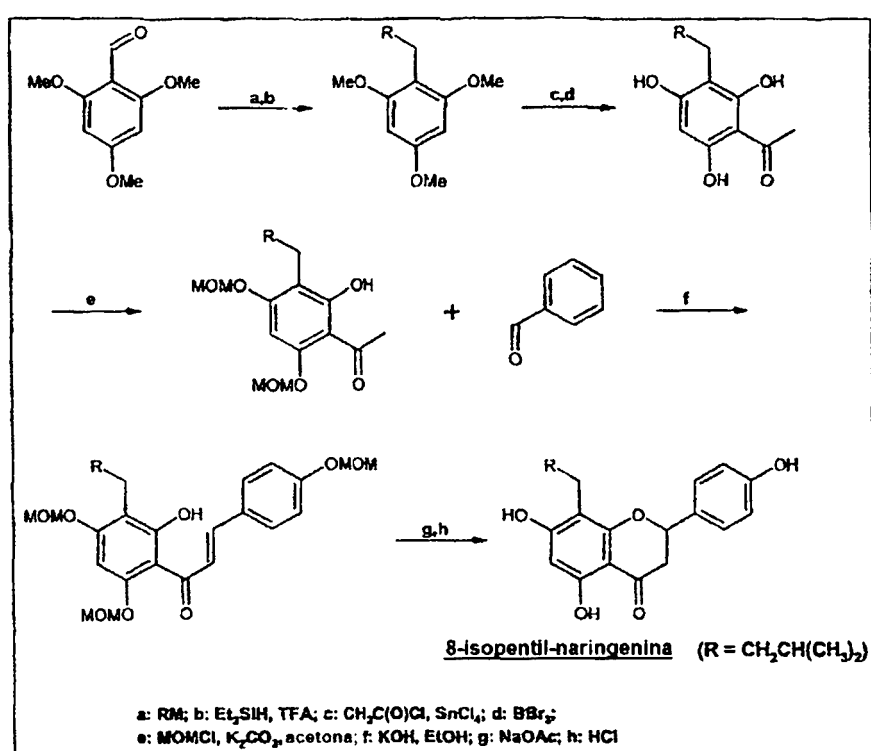


Figura 3. Esquema de la síntesis para preparar 8-alkil-naringeninas, incluida 8-isopentil-naringenina.

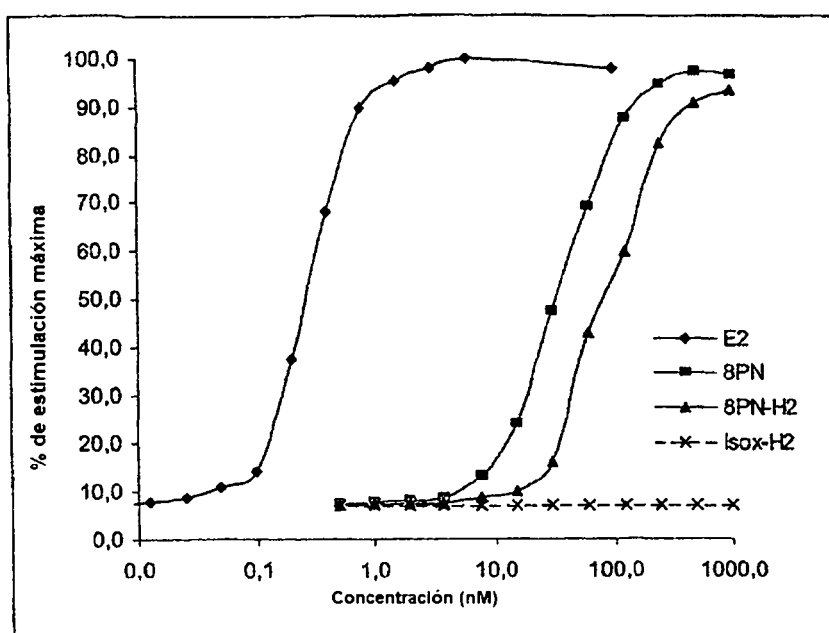


Figura 4. Curvas de respuesta a la dosis de la actividad estrogénica de 17 β -estradiol (E2), 8-prenilnaringenina (8-PN), 8-isopentil-naringenina (8-PN-H2) y dihidro-xantohumol (Isox-H2), en la pantalla de levadura inducible por estrógeno.