

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 960 685**

51 Int. Cl.:

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2019** **PCT/EP2019/050536**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2020** **WO20011402**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2019** **E 19700185 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2023** **EP 3820527**

54 Título: **Solubilizado de xantohumol**

30 Prioridad:

11.07.2018 WO PCT/EP2018/068801

11.07.2018 WO PCT/EP2018/068731

11.07.2018 WO PCT/EP2018/068729

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
06.03.2024

73 Titular/es:

AQUANOVA AG (100.0%)

Birkenweg 8-10

64295 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

BEHNAM, DARIUSH

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 960 685 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

Solubilizado de xantohumul

5 La invención se refiere a un solubilizado anhidro con xantohumul según la reivindicación 1. Además, la invención se refiere a un fluido que contiene un solubilizado de este tipo y una cápsula llena con un solubilizado o fluido de este tipo.

10 Xantohumul es un flavonoide que se produce naturalmente en el lúpulo. A este respecto, se trata de un polifenol vegetal prenilado, que se asigna a las calconas y hasta ahora se ha identificado exclusivamente en el lúpulo. A este respecto, las variedades de lúpulo amargas presentan un contenido claramente más alto en xantohumul que las variedades aromáticas.

15 En la solicitud de patente europea EP 1 431 385 A1 se describen una bebida que contiene xantohumul y un procedimiento para su producción. Por ejemplo, puede prepararse para ello una formulación de xantohumul con Tween 60, calentándose el Tween 60 e introduciendo xantohumul a una temperatura de 95 °C.

20 En ensayos se mostró que el xantohumul es eficaz contra la producción y desarrollo de células cancerígenas. En ensayos de laboratorio pudo determinarse además que el xantohumul puede proteger las células nerviosas del cerebro y por ello posiblemente podría ayudar a ralentizar el desarrollo de la enfermedad en caso de enfermedades como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson.

25 Por ejemplo, se informa en <http://www.besserlaengerleben.at/gesund-y-fit/hopfen-hilft-gegen-cholesterin-y-blutzucker.html> sobre estudios, según los cuales parece que el xantohumul reduce el nivel en plasma de PCSK9, una proteína que desempeña un papel importante en los niveles del colesterol. Una reducción de los niveles de PCSK9 podría mejorar la degradación del colesterol LDL de la sangre. Científicos de la Universidad del Estado de Oregón han comprobado que la ingesta de grandes cantidades de xantohumul en el caso de animales de ensayo puede conducir a mejoras en el síndrome metabólico y a un aumento de peso reducido. Estos resultados de la investigación podrían

30 llevar a nuevos planteamientos de tratamiento en caso de obesidad, hipercolesterolemia e hiperglucemia. La combinación de estos problemas de salud, conocidas como el síndrome metabólico, pertenecen actualmente a las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo 2 en los países industrializados a las causas de muerte más frecuentes.

35 El xantohumul está naturalmente presente en el lúpulo y, por tanto, en la cerveza. Las cantidades máximas usadas en el estudio corresponderían en seres humanos a una dosis de 350 miligramos por día para una persona. Sin embargo, este valor supera claramente a aquel que puede conseguirse mediante una alimentación normal. Sin embargo, una ingesta a través de un suplemento alimenticio teóricamente sería posible sin problemas.

40 En la actualidad, como suplementos alimenticios están comercialmente disponibles los extractos de lúpulo. Sin embargo, se ha mostrado que la biodisponibilidad del xantohumul solo es escasa en caso de ingesta oral de extractos de lúpulo.

45 Por tanto, un objetivo de la invención es facilitar una formulación de xantohumul, que muestre una biodisponibilidad mejorada en comparación con xantohumul nativo de extractos de lúpulo.

Otro objetivo de la invención es facilitar una formulación de xantohumul, que consiga un efecto antiinflamatorio mejorado en comparación con el xantohumul nativo, sin que se modifique químicamente el principio activo xantohumul.

50 Estos objetivos se consiguen con ayuda de la invención de manera sorprendentemente sencilla con un solubilizado según la reivindicación 1.

La invención proporciona un solubilizado anhidro que está constituido por xantohumul con una proporción inferior o igual al 35 % en peso, preferiblemente, inferior o igual al 15 % en peso, de manera especialmente preferible, del 2 % en peso al 12 % en peso y al menos un emulsionante con un valor HLB en el intervalo entre 13 y 18, que está

55 particularmente seleccionado del grupo que comprende polisorbato 80, polisorbato 20, ésteres sacáridos de ácidos grasos alimentarios (E 473) y fosfolípidos, en particular, lecitina, y mezclas de al menos dos de los emulsionantes mencionados, y hasta el 35 % en peso, preferiblemente, hasta el 20 % en peso, de manera especialmente preferible, hasta el 15 % en peso de etanol y, opcionalmente, hasta el 25 % en peso, preferiblemente, hasta el 10 % en peso de glicerol. Tal como se menciona con más detalle a continuación, el solubilizado según la invención presenta una

60 biodisponibilidad mejorada en comparación con el xantohumul nativo de extractos de lúpulo, así como un efecto antiinflamatorio mejorado en comparación con el xantohumul nativo.

El solubilizado según la invención se trata de una mezcla formulada de manera coloidal como relleno para cápsulas, que contiene xantohumul como principio activo bioactivo. Con la invención ya se puede crear, únicamente a partir de emulsionante y xantohumul, un solubilizado con micelas estables también en condiciones fisiológicas. Sin embargo, el solubilizado también puede ser una mezcla que, además de xantohumul, esté constituida principalmente por

coadyuvantes tecnológicos, sustancias de soporte, materiales de relleno y estabilizadores. El solubilizado según la invención es anhidro o bien no es acuoso. Está diseñado para usarse como relleno de cápsulas. En particular, si bien es líquido, no es una bebida.

5 Como condición previa para la absorción de micronutrientes liposolubles del cuerpo humano o animal se considera la formación de las denominadas “micelas mixtas fisiológicas” con ayuda de ácidos biliares, sales biliares y enzimas del tracto digestivo. Por ello, el solubilizado según la invención presenta de manera análoga a este principio natural y ante el hecho de la optimización de la biodisponibilidad del xantohumol una estructura micelar estable. La mejora de la biodisponibilidad puede conseguirse de este modo precisamente cuando resulta estable la micela en condiciones
10 fisiológicas (es decir, a una temperatura de 37 °C y un pH 1,1) y alcanza el intestino delgado sin dañarlo.

Debido a la alta proporción de xantohumol, la invención prevé en una configuración ventajosa que el solubilizado contenga como fuente de xantohumol un extracto etanólico de las resinas duras del lúpulo, en donde el xantohumol se encuentra en este extracto en una concentración en el intervalo entre el 60 % en peso y el 95 % en peso, preferiblemente, en una concentración en el intervalo del 65 % en peso al 85 % en peso. En particular, los productos “Xantho-Flav pur” y “Xantho-Flav”, explicados con más detalle a continuación pueden usarse en el contexto de la invención como fuente de xantohumol.

En una forma de realización preferida, el solubilizado según la invención contiene como emulsionante polisorbato 80 o polisorbato 20, o una mezcla de polisorbato 20 y polisorbato 80. Como ventaja, la invención crea a este respecto la posibilidad de poder seleccionar el emulsionante o la composición de emulsionante para la producción de micelas estables de xantohumol también en condiciones fisiológicas (pH 1,1 y 37 °C). De ese modo, también puede usarse como emulsionante al menos un éster sacárido de un ácido graso alimentario o una mezcla de varios ésteres sacáridos de ácidos grasos alimentarios. Además, la parte inventora ha descubierto que también puede usarse como
25 emulsionante en el contexto de la invención la mezcla de polisorbato 80 o polisorbato 20, o una mezcla de polisorbato 80 y polisorbato 20 con al menos un éster sacárido de un ácido graso alimentario. Además, puede usarse como emulsionante en el contexto de la invención una mezcla al menos de un fosfolípido, por ejemplo, lecitina, con al menos un éster sacárido de un ácido graso alimentario.

De ese modo, la invención ofrece la ventaja de poder ajustar la composición dependiendo de qué otros componentes deba contener el solubilizado y en qué relaciones de cantidad, sus propiedades en cuanto a la biodisponibilidad, estabilidad en almacenamiento e interacciones con el material de las cápsulas, en las que debe facilitarse el solubilizado para la administración oral.

Se ha demostrado que, dependiendo de cuánto xantohumol deba solubilizarse y, en particular, también dependiendo de la cuestión de si otros principios activos deben micelarse adicionalmente al xantohumol, la relación en masa de emulsionante, en particular, de polisorbato 80, con respecto a xantohumol puede ajustarse en el intervalo entre 30:1 y 3:1, preferiblemente, en el intervalo entre 25:1 y 5:1, preferiblemente, en el intervalo entre 9,8:1 y 6,6:1.

Para ello, la proporción de emulsionante, en particular, la proporción de polisorbato se encuentra según la invención en al menos el 45 % en peso, preferiblemente, en el intervalo entre el 60 % en peso y el 95 % en peso, de manera especialmente preferible, en el intervalo entre el 73 % en peso y el 90 % en peso. Dependiendo de cuánto emulsionante pueda usarse para un fin de uso determinado del solubilizado, la invención ofrece la posibilidad de que el solubilizado contenga hasta el 35 % en peso, preferiblemente, hasta el 20 % en peso, de manera especialmente preferible, hasta el 15 % en peso de etanol. Mediante la adición de etanol puede reducirse la proporción de polisorbato, lo que representa una ventaja en cuanto al valor de IDA para el polisorbato.

Para la formación de micelas estables, dependiendo de qué principios activos y en qué cantidad deban solubilizarse, puede ser útil que el solubilizado contenga hasta el 25 % en peso, preferiblemente, hasta el 10 % en peso de glicerol. Mediante la adición de glicerol también puede reducirse la proporción de polisorbato.

Los solubilizados según la invención también tienen en las condiciones fisiológicas de un tránsito gástrico una estrecha distribución del tamaño de partícula con pequeños tamaños de partícula promedio, preferiblemente, la distribución del diámetro de las micelas en una dilución del solubilizado con agua destilada en la relación de 1:500 a un pH 1,1 y 37 °C alcanza de aproximadamente $d_{10} = 70$ nm a aproximadamente $d_{90} = 160$ nm. Estos valores se determinaron por medio de una distribución de intensidad. Las particularidades con respecto al análisis del tamaño de partícula de las micelas de los solubilizados se explican a continuación.

La invención facilita ventajosamente solubilizados con propiedades antiinflamatorias muy buenas. La actividad antiinflamatoria del solubilizado de xantohumol medida como concentración de proteína C reactiva (PCR) en el suero sanguíneo de ratas artríticas tras una única administración del solubilizado en una dosificación de 5 mg/kg de peso corporal se encuentra en el intervalo de aproximadamente 2500 pg/ml a aproximadamente 2700 pg/ml y, por tanto, es claramente inferior a la concentración de proteína C reactiva (PCR) en el suero sanguíneo de ratas artríticas tras una única administración de xantohumol nativo en una dosificación de 5 mg/kg de peso corporal, que se encuentra en el intervalo de aproximadamente 3300 pg/ml a aproximadamente 3700 pg/ml. Para ello, a continuación se hace referencia a la figura 1c adjunta y a su descripción.

En comparación, la actividad antiinflamatoria de un solubilizado con xantohumol y curcumina medida como concentración de proteína C reactiva (PCR) en el suero sanguíneo de ratas artríticas tras una única administración del solubilizado en una dosificación de xantohumol y curcumina de 5 mg/kg de peso corporal en cada caso se encuentra en el intervalo de aproximadamente 2000 pg/ml a aproximadamente 2400 pg/ml y, por tanto, es claramente inferior a la concentración de proteína C reactiva (PCR) en el suero sanguíneo de ratas artríticas tras una única administración de xantohumol nativo y curcumina nativa en una dosificación de 5 mg/kg de peso corporal en cada caso, que se encuentra en el intervalo de aproximadamente 3200 pg/ml a aproximadamente 3600 pg/ml. En este contexto se hace referencia a continuación a la figura 1b adjunta y a la correspondiente descripción.

El efecto antiinflamatorio de un solubilizado de xantohumol según la invención, medido como concentración de mieloperoxidasa (MPO) en el suero sanguíneo de ratas artríticas se encuentra tras una única administración del solubilizado en una dosificación de 5 mg/kg de peso corporal en el intervalo de aproximadamente 800 mU/ml a aproximadamente 900 mU/ml y, por tanto, es claramente inferior a la concentración de mieloperoxidasa (MPO) en el suero sanguíneo de ratas artríticas tras una única administración de xantohumol nativo en una dosificación de 5 mg/kg de peso corporal, que se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1100 mU/ml a aproximadamente 1200 mU/ml. En este contexto, se hace referencia a continuación a la figura 4 adjunta y a la correspondiente descripción.

La unidad de enzima (U) es una unidad con el tiempo sustituida por el Katal para la indicación de la actividad enzimática. Dado que con el uso del Katal se modifican los valores numéricos, se usa además la unidad de enzima (U) en medicina y química clínica. Una unidad de enzima U corresponde a la conversión de un micromol de sustrato por minuto.

El efecto antiinflamatorio de un solubilizado con xantohumol y curcumina medida como concentración de mieloperoxidasa (MPO) en el suero sanguíneo de ratas artríticas tras una única administración del solubilizado en una dosificación de xantohumol y curcumina de 5 mg/kg de peso corporal en cada caso se encuentra en el intervalo de aproximadamente 550 mU/ml a aproximadamente 600 mU/ml y, por tanto, es claramente inferior a la concentración de mieloperoxidasa (MPO) en el suero sanguíneo de ratas artríticas tras una única administración de xantohumol nativo y curcumina nativa en una dosificación de 5 mg/kg de peso corporal en cada caso, que se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1100 mU/ml a aproximadamente 1300 mU/ml. En este contexto, se hace referencia a continuación a la figura 3 adjunta y a la correspondiente descripción.

Mediante la determinación de la turbidez del solubilizado mucho más accesible desde el punto de vista técnico de medición se obtiene una indicación sobre la biodisponibilidad mejorada en comparación con xantohumol nativo o composiciones que no se han micelado según la invención de xantohumol con curcumina y/o glavonoide. La turbidez del solubilizado, preferiblemente, como consecuencia de la formulación según la invención, es inferior a 100 FNU, preferiblemente, inferior a 50 FNU, medida mediante medición de luz dispersa con luz infrarroja según las especificaciones de la norma ISO 7027 con una dilución del solubilizado en la relación 1:50 en agua con un pH 1,1 y 37 °C.

La correlación entre la carga de una micela con xantohumol y su estabilidad discurre a este respecto de manera inversamente proporcional. Correspondientemente, el aumento de la carga lleva a una mayor inestabilidad de la micela. Únicamente las micelas intactas llevan a un aumento de la biodisponibilidad. Tal como muestran las distribuciones de tamaño de partícula estrechas y también la turbidez extraordinariamente baja de los solubilizados según la invención, la invención ofrece la gran ventaja de facilitar micelas estables altamente cargadas, que son estables también en condiciones fisiológicas y, por tanto, consiguen una alta biodisponibilidad del xantohumol.

Para permitir la administración oral del solubilizado según la invención de manera sencilla y agradable para los consumidores o bien pacientes, la invención facilita además una cápsula llena con un solubilizado anhidro anteriormente descrito, en donde la cápsula está formada como cápsula de gelatina blanda o cápsula de gelatina dura o como cápsula blanda, sin gelatina o como cápsula dura, sin gelatina, en particular, como cápsula de celulosa.

El solubilizado según la invención puede incorporarse en el contexto de la invención además en otros fluidos, en particular, líquidos. A este respecto, los rellenos de principios activos siguen siendo pequeñas micelas. Por consiguiente, la invención facilita también un fluido que contiene un solubilizado descrito anteriormente, en donde el fluido está seleccionado del grupo que comprende alimentos, bebidas, productos cosméticos y productos farmacéuticos. En particular, el fluido puede comprender una dilución acuosa del solubilizado.

La invención proporciona además un procedimiento para la producción de un solubilizado descrito anteriormente con xantohumol con las siguientes etapas:

a) disponer al menos un emulsionante con un valor de HLB en el intervalo entre 13 y 18, que está seleccionado, en particular, del grupo que comprende polisorbato 80, polisorbato 20, ésteres sacáridos de ácidos grasos alimentarios (E 473) y fosfolípidos, en particular, lecitina, y mezclas de al menos dos de los emulsionantes mencionados,

b) añadir etanol,

c) calentar a una temperatura de hasta 85 °C, preferiblemente, hasta 80 °C, mezclando por ejemplo mediante agitación,

5 d) añadir una extracción etanólica de las resinas duras del lúpulo, en particular, polvo de Xantho-Flav pur y/o polvo de Xantho-Flav, mezclando por ejemplo mediante agitación,

en donde en la etapa d) se realiza un calentamiento a temperatura en el intervalo de 81 °C a 90 °C, de manera especialmente preferible, a una temperatura en el intervalo de 83 °C y 87 °C.

10 Si el solubilizado según la primera variante de procedimiento debe contener también etanol, la invención prevé realizar antes de la etapa b) una etapa de

15 b) disolver el extracto etanólico de las resinas duras del lúpulo, en particular, polvo de Xantho-Flav pur, en etanol con calentamiento a una temperatura en el intervalo de 40 °C a 62 °C, preferiblemente, a una temperatura en el intervalo de 45 °C a 57 °C, de manera especialmente preferible, a una temperatura en el intervalo de 48 °C y 52 °C.

20 En cualquier caso, en caso necesario, para favorecer el proceso de mezclado o de disolución, puede realizarse en la etapa c) un calentamiento a una temperatura más baja en el intervalo de 40 °C a 62 °C, preferiblemente, a una temperatura en el intervalo de 45 °C a 57 °C, de manera especialmente preferible, a una temperatura en el intervalo de 48 °C y 52 °C.

25 Además, en el contexto de la invención, dependiendo de qué composición de emulsionante se haya seleccionado para el caso de aplicación respectivo, puede realizarse en la etapa b) una adición de un fosfolípido, en particular, una adición de lecitina, junto con etanol. En la etapa b) también es posible añadir glicerol y/o agua junto con etanol.

La invención se explica con más detalle a continuación por medio de ejemplos de realización. A este respecto, se usaron los siguientes componentes.

30 Xantohumol

Como fuente de xantohumol se usaron los productos "Xantho-Flav pur" o "Xantho-Flav 75 % (65-85 %)" de la marca "Hopsteiner" de Simon H. Steiner, Hopfen, GmbH, Mainburg, Alemania. En el caso de ambos se trata de un producto natural que se produce a partir de lúpulo. El componente activo es el polifenol de lúpulo xantohumol. Se trata de un polvo de color amarillo con un contenido en xantohumol según las indicaciones del fabricante de al menos el 85 % en el caso de "Xantho-Flav pur". El contenido en xantohumol de "Xantho-Flav 75 % (65 - 85 %)" en los ejemplos de realización presentados a continuación ascendía a al menos el 70 %. Las concentraciones de xantohumol e isoxantohumol en "Xantho-Flav pur" las cuantifica el fabricante según el análisis mediante espectrofotometría UV o según HPLC EBC 7.8 a través del patrón de calibración externo de XN puro (370 nm) o IX (290 nm). "Xantho-Flav pur" contiene el flavonoide prenilado xantohumol en una concentración muy alta. Para los ejemplos de realización en el contexto de la presente solicitud se usó "Xantho-Flav pur" de número de lote 9432.

Polisorbato 80

45 Como fuente de polisorbato 80 se usó el material "TEGO SMO 80 V FOOD" con el código de especificación "K04 EU-FOOD" de Evonik Nutrition & Care GmbH, Essen, Alemania. El producto se corresponde con los requerimientos de la UE del aditivo alimentario E 433. En los ejemplos de realización descritos a continuación también pueden usarse como alternativa al mencionado TEGO SMO 80 V de Evonik como polisorbato 80 TEGO SMO 80 V de InCoPA GmbH, Illertissen, Alemania o Crillet 4/Tween 80-LQ-(SG) de CRODA GmbH, Nettetal, Alemania o Lamesorb SMO 20, así como Kotilen-O/1 VL de Univar o de Kolb Distributions AG, Hedingen, Suiza.

Ésteres sacáridos de ácidos grasos alimentarios (E473)

55 Como ésteres sacáridos de ácidos grasos alimentarios (E 473) pueden usarse ésteres sacáridos individuales de ácidos grasos alimentarios (E 473) o mezclas de al menos dos ésteres sacáridos de ácidos grasos alimentarios. Los ésteres sacáridos de ácidos grasos alimentarios adecuados son, en particular, monolaurato de sacarosa, dilaurato de sacarosa, monopalmitato de sacarosa, dipalmitato de sacarosa, monoestearato de sacarosa y diestearato de sacarosa. Para los ejemplos de realización descritos a continuación se usaron los productos "Ryoto L-1695", "Ryoto P-1670" y "Ryoto M- 1695" del fabricante Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation. Además, se usó como ésteres sacáridos de ácidos grasos alimentarios (éster de sacarosa, E 473) el producto "DUB SE 16 P" del fabricante Stearinerie Dubois. El producto "DUB SE 16 S" también puede usarse para la producción de solubilizados de xantohumol según la invención.

65 Como fosfolípido se usó lecitina en forma del producto "Epikuron® 135 F" o "Epikuron® 135 F IP (libre de GMO) (35 % o 32 % de fosfatidilcolina en aceite de soja)" de Cargill Inc.

Glicerol

Como glicerol se usó en el contexto de la presente solicitud el producto "Glycamed 99,7 %" de Glaconchemie GmbH, Merseburg, Alemania. Según las indicaciones del fabricante, el contenido en glicerol de este producto es de al menos el 99,5 %.

Etanol

El etanol se adquirió en el contexto de la presente solicitud de Berkel pfälzische Spritfabrik GmbH & Co. KG. Según la especificación de "Alcohol neutro sin desnaturalizar" 1411U tributado" el contenido en etanol de este producto es de aproximadamente 94 +/- 1 %.

Como agua se usó agua destilada.

Los análisis del tamaño de partícula de las micelas en diluciones acuosas de solubilizados según la invención se midieron según el principio de la dispersión de luz dinámica con luz láser de la longitud de onda 780 nm. Las mediciones del tamaño de partícula se realizaron con el analizador de partículas por retrodispersión ParticleMetrix NANOFLEX. El principio de medición se basa en la dispersión de luz dinámica (DLS) en una disposición de retrodispersión heterodina de 180°. Con esta geometría, una parte del rayo láser se mezcla para ello con la luz dispersa (tecnología heterodina). Debido al pequeño recorrido de la luz de 200 micrómetros a 300 micrómetros en la muestra, la retrodispersión es ventajosa para muestras absorbentes y altamente concentradas. La tecnología heterodina tiene un efecto cada vez mayor en la relación señal/ruido y en la sensibilidad del intervalo inferior a 100 nm.

La luz láser se acopla a la horquilla en Y de una fibra óptica. La luz láser parcialmente reflejada desde la ventana de zafiro de la cámara de muestra y la luz retrodispersa desde la muestra vuelven a la misma fibra. El detector situado en la segunda rama de la horquilla en Y registra las señales que interfieren entre sí. Una evaluación rápida de la transformación de Fourier descompone los componentes fluctuantes de la luz dispersa en un denominado "espectro de potencia" que depende de la frecuencia. Cada componente de frecuencia representa una constante de difusión browniana y, por tanto, puede asignarse a un tamaño de partícula. La fórmula de Stokes-Einstein se utiliza para la conversión en una distribución del tamaño de partícula:

$$D = k \frac{T}{3\pi\eta d_p}$$

Esta ecuación incluye la constante de difusión D, la constante de Boltzmann k, la temperatura T, la viscosidad dinámica η del medio y el diámetro d_p de las partículas. Se coloca un sensor de temperatura en el aparato de medición cerca de la muestra próximo a la ventana de zafiro.

Para determinar experimentalmente la turbidez de los solubilizados según la invención, los dispositivos de medición de turbidez se calibran con una suspensión estándar. Por lo tanto, la indicación no se muestra en forma de intensidad luminosa medida, sino de concentración de la suspensión de calibración. Por tanto, en la medición de una suspensión cualquiera, la indicación significa, que el líquido en cuestión provoca la misma dispersión de luz que la suspensión estándar de la concentración mostrada. El estándar de turbidez establecido internacionalmente es la formacina. A las unidades más comunes pertenece la indicación "FNU", que significa "Formazine Nephelometrie Units" (unidades de formacina nefelométricas). Esta es la unidad usada por ejemplo en el tratamiento de agua para la medición a 90° según las especificaciones de la norma ISO 7072.

Ejemplo comparativo 1

Solubilizado de Xantho Flav pur al 10 %

Se usan

100 g de Xantho Flav pur y

900 g de polisorbato 80.

Para ello, se introduce el polvo de Xantho Flav pur mediante agitación en polisorbato 80. El polvo se añade en este caso con tal velocidad que se absorbe de manera uniforme en el emulsionante. Con un calentamiento de 83 a 87 °C se homogeneiza posteriormente. Después de que se haya conseguido un solubilizado homogéneo, se enfría a una temperatura por debajo de 60 °C. El solubilizado de Xantho Flav se envasa entonces y se almacena en oscuridad y frío, es decir por debajo de 25 °C.

Ejemplo de realización 2

Solubilizado de Xantho Flav pur al 10 % con etanol

Para esta variante de un solubilizado de xantohumol según la invención se usan

100 g de Xantho Flav pur,

150 g de etanol (al 96 %) alcohol neutro grado 1411U y

750 g de polisorbato 80.

En primer lugar, se disuelve el polvo de Xantho Flav pur en etanol y, a este respecto, se calienta a una temperatura en el intervalo entre 48 y 52 °C. Se produce una solución homogénea. Entonces se añade polisorbato 80 con calentamiento de 83 a 87 °C para la disolución de Xantho Flav pur en etanol. La adición se realiza a tal velocidad que los dos fluidos se homogeneizan adecuadamente mediante agitación. El solubilizado producido se enfría hasta por debajo de 60 °C y se envasa y se almacena en oscuridad y frío, es decir, a temperaturas por debajo de 25 °C.

Ejemplo de realización 2A

Un solubilizado de Xantho Flav pur al 10 % con etanol también puede producirse con menos etanol y más polisorbato 80.

Para esta variante de un solubilizado de xantohumol según la invención se usan

100 g de Xantho Flav pur,

100 g de etanol (al 96 %) alcohol neutro grado 1411U y

800 g de polisorbato 80.

En primer lugar, se disuelve el polvo de Xantho Flav pur en etanol y en este se calienta a una temperatura en el intervalo entre 56 y 60 °C. Se produce una solución homogénea. La producción posterior se corresponde con el ejemplo de realización 2.

Ejemplo de realización 3

Solubilizado de Xantho Flav pur al 12 % con etanol

Para la producción se usan

120 g de Xantho Flav pur,

150 g de etanol (al 96 %) alcohol neutro grado 1411U y

730 g de polisorbato 80.

La producción del solubilizado de Xantho Flav pur al 12 % se realiza al igual que en el ejemplo de realización 2.

Los solubilizados producidos son marrón oscuro y pueden fluir adecuadamente a pesar de su ligera viscosidad. Disuelto en agua en una relación de 1:50 a de aproximadamente 40 a 50 °C se produce una solución de color entre amarillo oscuro y ocre, ligeramente turbia. Por medio de mediciones de HPLC se confirmó en el solubilizado de Xantho Flav al 10 % con etanol el contenido del Xantho Flav del 10 % incluido en las micelas. A través de una medición en aerómetro a 20 °C se determinó la densidad de este solubilizado hasta de 1 a 1,1 g/cm³. El valor de pH del solubilizado se encontraba entre 5 y 7 en la solución preparada con agua en la relación 1:50. El número de germen total era inferior o como máximo igual a 1000/g. Levaduras y mohos se encontraban en como máximo 100/g y en 1 g de solubilizado no pudo detectarse E.coli o bien gérmenes coliformes según el método de la Farmacopea Europea de la versión válida en octubre de 2014.

Para el solubilizado de xantohumol con etanol según el ejemplo de realización 2 se realizaron mediciones de turbidez con una dilución en la relación 1:50 en agua con un valor de pH de 1,1 y una temperatura de 37 °C, es decir, en condiciones fisiológicas. El valor determinado a través de tres muestras asciende a 40,9 FNU, que se calcula a partir de valores individuales de 26,0 FNU, 6,4 FNU y 90,2 FNU.

Para la medición del tamaño de partícula del solubilizado de xantohumol con etanol según el ejemplo de realización 2, se diluyó este, en primer, lugar en la relación 1:500 con agua destilada y se llevó hasta 37 °C con agitación continua con un agitador magnético y con ayuda de una placa de calefacción.

A continuación, se ajustó el valor de pH con ácido clorhídrico al 32 % hasta 1,1. A continuación, se midieron las muestras de inmediato. Los resultados de la distribución de intensidad se han recopilado en la siguiente tabla.

5	d ₁₀ (nm)	d ₅₀ (nm)	d ₉₀ (nm)	d ₉₉ (nm)
	76,90	107,0	155,3	212,9

Ejemplo de realización 4

Un solubilizado de xantohumul según la invención puede producirse también con adición de glicerol.

Solubilizado de Xantho Flav pur al 3,8 % con glicerol

Para la producción de 875 g de solubilizado se utilizan

33,3 g de polvo de Xantho-Flav pur

33,3 g de glicerol al 99,5 %

808,4 g de polisorbato 80.

Se mezclan polisorbato 80 y glicerol con agitación y, en este caso, se calientan a una temperatura en el intervalo de 48 a 52 °C, para homogeneizar bien la mezcla. El etanol se incorpora a la mezcla de polisorbato-glicerol agitando con fuerza de manera que se forma una solución homogénea. La temperatura se mantiene constante a este respecto. Entonces se incorpora xantohumul a la solución de polisorbato, glicerol y etanol. En esta se eleva la temperatura a un valor en el intervalo entre 63 y 67 °C. Se agita con fuerza, de manera que se integre el xantohumul de manera homogénea en la solución dispuesta.

Otra posibilidad de producir un solubilizado según la invención está en el uso de ésteres sacáridos de ácidos grasos alimentarios como emulsionante.

Ejemplo de realización 5

Solubilizado de Xantho Flav al 10 %

Se usan

100 g	polvo de Xantho-Flav,
598,5 g	éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "Ryoto L-1695" y,
301,5 g	etanol al 96 % alcohol neutro grado 1411U.

El éster sacárido se mezcla con etanol agitando a temperatura ambiente en el intervalo de temperatura de 20 °C a 25 °C inclusive, de modo que se forma una mezcla homogénea. Esta se calienta con agitación hasta una temperatura de como máximo 80 °C con agitación. Se continúa agitando hasta que se haya conseguido una solución homogénea y transparente. Entonces se añade el polvo de Xantho-Flav y se continúa calentando con agitación a una temperatura en el intervalo de 83 °C a 97 °C. Se agita con fuerza de manera que se integre el xantohumul de manera homogénea en la solución dispuesta. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, el solubilizado es marrón oscuro y transparente. En este estado se envasa y entonces se almacena.

Ejemplo de realización 6

Solubilizado de Xantho Flav al 5 %

Se usan

50 g	polvo de Xantho-Flav,
627 g	éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) y
323 g	etanol al 96 % alcohol neutro grado 1411U.

El éster sacárido de ácidos grasos alimentarios usado es una mezcla de

41 % en peso de monolaurato de sacarosa,

32 % en peso de monopalmitato de sacarosa,

5 9 % en peso de dilaurato de sacarosa,

8,5 % en peso de dipalmitato de sacarosa,

7 % en peso de monoestearato de sacarosa y

10 2,5 % en peso de diestearato de sacarosa.

Este éster sacárido se mezcla con etanol con agitación a temperatura ambiente en el intervalo de temperatura de 20 °C a 25 °C inclusive, de modo que se forma una mezcla homogénea. A este respecto, puede realizarse un ligero calentamiento a una temperatura en el intervalo de 48 °C a 52 °C. Se continúa agitando hasta que se haya conseguido una mezcla o solución homogénea. Entonces se añade el polvo de Xantho-Flav y se continúa calentando con agitación a una temperatura en el intervalo de 83 °C a 97 °C. Se agita con fuerza de manera que se integre el xantohumol de manera homogénea en la solución dispuesta. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, el solubilizado es marrón oscuro y transparente. En este estado se envasa y entonces se almacena.

20 Ejemplo de realización 7

Solubilizado de Xantho Flav al 5 %

25 Se usan

50 g polvo de Xantho-Flav,

313,5 g éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "Ryoto L-1695",

30 313,5 g éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "Ryoto P-1670" y

323 g etanol al 96 % alcohol neutro grado 1411U.

35 Los dos ésteres sacáridos en polvo se añaden conjuntamente. En esta etapa no es necesario un proceso de mezclado. Entonces los ésteres sacáridos se mezclan con etanol agitando a temperatura ambiente en el intervalo de temperatura de 20 °C a 25 °C inclusive, de modo que se forma una mezcla homogénea. Esta se calienta con agitación hasta una temperatura de como máximo 80 °C con agitación. Se continúa agitando hasta que se haya conseguido una solución homogénea y transparente. Entonces se añade el polvo de Xantho-Flav y se continúa calentando con agitación a una temperatura en el intervalo de 83 °C a 97 °C. Se agita con fuerza de manera que se integre el xantohumol de manera homogénea en la solución dispuesta. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, el solubilizado es marrón oscuro y transparente. En este estado se envasa y entonces se almacena.

Ejemplo de realización 8

45 Solubilizado de Xantho Flav al 5 %

Se usan

50 50 g polvo de Xantho-Flav,

613,75 g éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "Ryoto L-1695",

318,25 g etanol al 96 % alcohol neutro grado 1411U.

55 La producción del solubilizado se corresponde con el modo de proceder descrito en el ejemplo de realización 7 con un solo éster sacárido en lugar de los dos usados en ese caso.

Ejemplo de realización 9

60 Solubilizado de Xantho Flav al 5 %

Se usan

65 50 g polvo de Xantho-Flav,

5	142,5 g	éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "Ryoto L-1695",
	332,5 g	éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "DUB SE 16 P",
	304 g	etanol al 96 % alcohol neutro grado 1411U y
	171 g	glicerol.

Los dos ésteres sacáridos en polvo se añaden conjuntamente. En esta etapa no es necesario un proceso de mezclado.

- 10 Entonces, los ésteres sacáridos se mezclan con etanol y glicerol agitando con fuerza a temperatura ambiente en el intervalo de temperatura de 20 °C a 25 °C inclusive, de modo que se forma una mezcla homogénea. Esta se calienta con agitación hasta una temperatura de como máximo 80 °C con agitación. Se continúa agitando hasta que se haya conseguido una solución homogénea y transparente. Entonces se añade el polvo de Xantho-Flav y se continúa calentando con agitación a una temperatura en el intervalo de 83 °C a 97 °C. Se agita con fuerza de manera que se integre el xantohumul de manera homogénea en la solución dispuesta. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, el solubilizado es marrón oscuro y transparente. En este estado se envasa y entonces se almacena.

Ejemplo de realización 10

- 20 Solubilizado de Xantho Flav al 5 %

Se usan

25	50 g	polvo de Xantho-Flav,
	71,25 g	éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "Ryoto L-1695",
30	166,25 g	éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "DUB SE 16 P",
	475 g	polisorbato 80,
	152 g	etanol al 96 % alcohol neutro grado 1411U y
	82,5 g	glicerol.

- 35 Los ésteres sacáridos se mezclan con polisorbato 80, etanol y glicerol agitando a temperatura ambiente en el intervalo de temperatura de 20 °C a 25 °C inclusive, de modo que se forma una mezcla homogénea. A este respecto, puede realizarse un ligero calentamiento a una temperatura en el intervalo de 48 °C a 52 °C. Se continúa agitando hasta que se haya conseguido una mezcla o solución homogénea. Entonces se añade el polvo de Xantho-Flav y se continúa calentando con agitación a una temperatura en el intervalo de 83 °C a 97 °C. Se agita con fuerza de manera que se integre el xantohumul de manera homogénea en la solución dispuesta. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, el solubilizado es marrón oscuro y transparente.

Ejemplo de realización 11

- 45 Solubilizado de Xantho Flav al 5 %

Se usan

50	50 g	polvo de Xantho-Flav,
	313,5 g	éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "Ryoto M-1695",
55	313,5 g	éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "Ryoto P-1670",
	9,5 g	lecitina como fosfolípido y
	313,5 g	etanol al 96 % alcohol neutro grado 1411U.

- 60 Los dos ésteres sacáridos en polvo se añaden conjuntamente. En esta etapa no es necesario un proceso de mezclado. La lecitina se mezcla con etanol. A este respecto puede realizarse un ligero calentamiento a una temperatura en el intervalo de 40 °C a 50 °C. La mezcla de ésteres sacáridos se mezcla entonces con la mezcla de etanol y lecitina agitando con fuerza a temperatura ambiente en el intervalo de temperatura de 20 °C a 25 °C inclusive, de modo que se forma una mezcla homogénea. En caso necesario, puede realizarse a este respecto un ligero calentamiento a una temperatura en el intervalo de 40 °C a 50 °C. Este puede realizarse también mediante la adición de la mezcla de etanol y lecitina calentada previamente. La mezcla se calienta con agitación hasta una temperatura de como máximo 80 °C con agitación. Se continúa agitando hasta que se haya conseguido una solución homogénea y transparente. Entonces se añade el polvo de Xantho-Flav y se continúa calentando con agitación a una temperatura en el intervalo de 83 °C

a 97 °C. Se agita con fuerza de manera que se integra el polvo de Xantho-Flav o el xantohumol de manera homogénea en la solución dispuesta. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, el solubilizado es marrón oscuro y transparente. En este estado se envasa y entonces se almacena.

5 Ejemplo de realización 12

Solubilizado de Xantho Flav al 5 %

Se usan

10	50 g	polvo de Xantho-Flav,
	332,5 g	éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "Ryoto L-1695",
15	142,5 g	éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "DUB SE 16 P",
	152 g	etanol al 96 % alcohol neutro grado 1411U,
	85,5 g	glicerol y
20	237,5 g	agua.

Los dos ésteres sacáridos en polvo se añaden conjuntamente. En esta etapa no es necesario un proceso de mezclado. Los ésteres sacáridos se mezclan entonces con etanol, agua y glicerol agitando con fuerza a temperatura ambiente en el intervalo de temperatura de 20 °C a 25 °C inclusive, de modo que se forma una mezcla homogénea. Esta se calienta con agitación hasta una temperatura de como máximo 80 °C con agitación. Se continúa agitando hasta que se haya conseguido una solución homogénea y transparente. Entonces se añade el polvo de Xantho-Flav y se continúa calentando con agitación a una temperatura en el intervalo de 83 °C a 97 °C. Se agita con fuerza, de manera que se integre el xantohumol de manera homogénea en la solución dispuesta. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, el solubilizado es marrón oscuro y transparente. En este estado se envasa y entonces se almacena.

30 Ejemplo de realización 13

Solubilizado de Xantho Flav al 10 %

Se usan

35	100 g	polvo de Xantho-Flav,
	315 g	éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "Ryoto L-1695",
40	135 g	éster sacárido de ácidos grasos alimentarios (E 473) "DUB SE 16 P",
	144 g	etanol al 96 % alcohol neutro grado 1411U,
	81 g	glicerol y
45	225 g	agua.

La producción del solubilizado se corresponde con el modo de proceder descrito en el ejemplo de realización 12.

Si se ha concluido con una homogeneización suficientemente completa de los componentes para obtener un solubilizado según la invención, se comprueba en la producción a través de mediciones la claridad del producto con ayuda de un rayo láser. Una medición con rayo láser de este tipo puede realizarse por ejemplo mediante iluminación de la muestra con ayuda de un puntero láser habitual en el mercado, en particular, con una longitud de onda en el intervalo entre 650 nm y 1700 nm (color espectral rojo), y a continuación un control visual del solubilizado iluminado o irradiado. El control no se realiza mediante toma de muestras y, por tanto, fuera del recipiente de reacción, sino en el recipiente de reacción. El rayo láser se dirige por una mirilla, que se encuentra en el lado delantero del recipiente de reacción, de manera perpendicular al recipiente de reacción. Cuando en el lado interior trasero del recipiente de reacción aparece completamente libre de dispersión solo un punto de luz, las estructuras de partícula producidas en el recipiente de reacción son más pequeñas que la longitud de onda de la luz visible y, por consiguiente, es una comprobación óptica de que el proceso de micelización ha concluido.

Mediante los tamaños de partícula pequeños medidos se consigue ventajosamente la formación de un líquido transparente, en particular, para la percepción del ojo humano.

La claridad del solubilizado también puede representarse por su baja turbidez. Para ello, se aplica la siguiente hipótesis de trabajo: cuanto más transparente sea una dilución acuosa de un solubilizado u otra formulación de xantohumol, en particular, en condiciones fisiológicas de un tránsito gástrico, por tanto, con un valor de pH de 1,1 y una temperatura

de 37 °C, mejor es su solubilización. Cuanto mejor sea la solubilización, mejor es la biodisponibilidad del principio activo o del producto que este contiene.

5 Esta puede interpretarse ya en la turbidez especialmente baja del solubilizado, que puede entenderse como un tipo de parámetro de la biodisponibilidad. La turbidez de los solubilizados según la invención se determinó mediante medición de luz dispersa con luz infrarroja según las especificaciones de la norma ISO 7027.

10 La formulación según la invención transparente y soluble en agua de manera completamente estable presenta una transparencia estable de manera independiente del pH, sin coadyuvantes como en cápsulas de gelatina blanda y dura, en cápsulas (duras y/o blandas) sin gelatina y en productos finales líquidos a base de agua. Los productos con transparencia y solubilidad en agua de este tipo se investigan por parte de la industria pertinente de manera apremiante para productos innovadores como relleno para cápsulas. Una formulación de xantohumol que cumpla dichos requerimientos aún no existe hasta ahora según el conocimiento de la parte inventora.

15 Como consecuencia de la formulación según la invención en un solubilizado con micelas muy pequeñas, estables y resistentes a los jugos gástricos, la invención crea un solubilizado de xantohumol para su uso como suplemento alimenticio y/o fármaco, en particular, para su uso como suplemento alimenticio y/o fármaco para el tratamiento de adiposis.

20 En el contexto de la invención, puede ajustarse el contenido en xantohumol en los solubilizados individuales, dependiendo del caso de aplicación también claramente más alto que en el ejemplo mostrado.

25 Si se ajustan cargas de principio activo más altas, este proceso está limitado a que al sobrepasar el contenido en principio activo individual de cada composición, no se produce ningún solubilizado, sino una emulsión. Si se eleva el contenido en principio activo, se reducen necesariamente las correspondientes proporciones de los otros componentes (en % en peso). Por encima de un límite específico se obtiene un sistema disperso, que sin embargo no es soluble en agua de manera irreversible como los solubilizados según la invención y que presenta una turbidez medida muy baja para estos solubilizados en condiciones fisiológicas del tránsito gástrico, por tanto, con un pH 1,1 y a 37 °C. Las dispersiones de este tipo pueden ser (nano)emulsiones, sin embargo no son solubilizados, en los que se encuentran el principio activo o los principios activos incluidos en las micelas muy pequeñas. Sin embargo, según la experiencia de la parte inventora, solo los solubilizados permiten la biodisponibilidad claramente elevada del principio activo o de los principios activos según la invención, incluso cuando una emulsión permitía una carga de principio activo más alta.

35 En la facultad de medicina de la Universidad Friedrich-Alexander de Erlangen Nürnberg (FAU) se realizaron estudios para determinar la acción de xantohumol en el peso corporal. Se administró una dosis de 2,5 mg/kg de peso corporal al día de xantohumol. Para ello, se usó un solubilizado de la parte solicitante. Este se produjo a partir de 100 g de "Xantho-Flav Pur", 150 g de etanol al 96 % y 750 g de polisorbato 80. Para el ajuste de la concentración a 0,375 mg/ml se diluyó el solubilizado con agua doblemente destilada ("ddH₂O"). En las figuras adjuntas están caracterizados los correspondientes datos con "s-XN".

40 Para la comparación se realizaron experimentos correspondientes con la misma dosis de xantohumol nativo. Para la disolución del xantohumol nativo se usó una solución acuosa de metilhidroxipropilcelulosa (MHPC, 0,2 %, Methocel E4M Prmum CR, Hypromellose 2910 USP, Fragon Inc., Minnesota, EE.UU.). Los correspondientes datos están marcados con "n-XN".

45 Las soluciones se produjeron en cada caso de nuevo semanalmente y se almacenaron protegiéndolas de la luz y en frío.

50 Ratones macho de la especie C57BL/6 de 8 semanas de edad obtuvieron o una alimentación habitual o se alimentaron según la "dieta tipo occidental" del 15 % de manteca de cerdo, el 15 % de grasa de vaca, el 4 % de ácido palmítico, el 4 % de ácido esteárico, el 0,2 % de colesterol y el 30 % de sacarosa. En el grupo control (CTRL), que recibió la alimentación habitual, se proporcionó como terapia una solución acuosa de metilhidroxipropilcelulosa (MHPC, 0,2 %, methocel™ E4M prem) ("vehículo" VH), también en el grupo de "dieta de tipo occidental" ("WTD").

55 Otros grupos recibieron el solubilizado de xantohumol ("s-XN") de la parte solicitante o xantohumol nativo ("n-XN") adicionalmente a WTD. La terapia se realizó durante 8 semanas.

60 Tras siete semanas de la administración del solubilizado o del xantohumol nativo se realizó un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ipGTT). Tras 12 horas de ayuno se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de glucosa en una concentración de glucosa del 50 % (masa de glucosa por volumen) en una dosis de 3 mg de glucosa por g de peso corporal. La concentración de glucosa en la sangre se midió en muestras que se extrajeron de la vena de la cola antes ("valor de glucosa en ayunas"; "*fasting glucose*") y después de 30, 60, 80 y 120 minutos tras la administración de glucosa. La medición se realizó con un glucómetro del modelo "accutrend" (Roche, Mannheim, Alemania).

65

Para la cuantificación de lípidos hepáticos se extrajeron estos y se determinó la cantidad de triglicéridos (*“hepatic triglyceride level”*) por medio de un “kit de triglicéridos GPO” (Sigma, Deisenhofen, Alemania) como se describe en “Wobser y col.: “Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells”, *Cell Res* 2009; 19: 996 - 1005”.

El aislamiento de ARN de tejido hepático, la transcripción inversa (*“reverse transcription”*) y el análisis cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*“quantitative real-time PCR analysis”*) se realizaron aplicando la tecnología “LightCycler” (Roche) y pruebas específicas en cebadores como se describe en “Hellebrand y col.: “Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma”, *Carcinogenesis* 2006; 27: 64 - 72”.

Para el análisis histológico se fijaron muestras de tejido hepático de los ratones durante 24 horas en formalina al 4 % a temperatura ambiente, se secaron en serie de etanol creciente y se incrustaron en parafina. Secciones de estos bloques de tejido fijados en formalina con un espesor de 5 micrómetros se desparafinaron con xileno y se colorearon con hematoxilina y eosina, tal como se describe en “Dorn y col.: “Increased expression of c-Jun in nonalcoholic fatty liver disease”, *Lab Invest.* 2014; 94: 394 - 408”.

En las figuras adjuntas están representados gráficamente los resultados de los experimentos explicados. Muestran:

las figuras 1A a D efectos sobre el aumento de peso y la acumulación de grasa (visceral) con la administración de solubilizado de xantohumol (s-XN) o xantohumol nativo (n-XN) durante la alimentación WTD;

las figuras 1E y F efectos sobre el valor de glucosa en ayunas y la tolerancia a la glucosa con la administración de solubilizado de xantohumol (s-XN) o xantohumol nativo (n-XN) durante la alimentación WTD;

las figuras 2 efectos sobre la esteatosis, el peso del hígado y la cantidad de triglicéridos en el hígado con la administración de solubilizado de xantohumol (s-XN) o xantohumol nativo (n-XN) durante la alimentación WTD;

las figuras 3 efectos sobre la secreción de genes que provocan fibrosis en el hígado (*“hepatic expression of profibrogenetic genes”*) con la administración de solubilizado de xantohumol (s-XN) o xantohumol nativo (n-XN) durante la alimentación WTD y

las figuras 4 efectos sobre la secreción de proteínas que provocan cirrosis hepática con la administración de solubilizado de xantohumol (s-XN) o xantohumol nativo (n-XN) durante la alimentación WTD;

La indicación “*” en las figuras significa $p < 0,05$ en comparación con los datos para la “terapia” con el vehículo (VH). La indicación “#” en las figuras significa $p < 0,05$ en comparación con los datos para el grupo control (CTR).

En la Universidad de El Cairo en la facultad de farmacia en el Instituto de Farmacología se realizaron otros estudios por parte del Prof. Dr. M. T. Khayyal para determinar el efecto anti-inflamatorio de xantohumol, también en unión con curcumina, en cada caso en forma nativa o en forma solubilizada según la invención. Los resultados de estos ensayos están representados gráficamente en las siguientes figuras. Muestran:

la figura 5 efecto de xantohumol en forma nativa y solubilizada sobre el contenido en suero de PCR (pg/l) y

la figura 6 efecto de xantohumol en forma nativa y solubilizada sobre el contenido en suero de MPO (mU/ml).

La WTD originó no solo el aumento de peso (figura 1A), sino también un aumento significativo de la masa en tejido graso visceral y subcutáneo. Por medio de registros fotográficos de los animales de ensayo según las figuras 1C y 1D se mostró que la administración del solubilizado de xantohumol condujo a una reducción de la masa de grasa visceral.

Además, la alimentación con WTD llevó a un valor de glucosa en ayunas más alto (*“fasting glucose”*) y a una tolerancia a la glucosa reducida en comparación con ratones que se alimentaron con el control, lo que indica una resistencia a la insulina (véanse las figuras 1E y 1F). La administración del solubilizado de xantohumol según la invención condujo a una mejora significativa de los niveles elevados de glucosa en ayunas y de la tolerancia a la glucosa, mientras que el xantohumol nativo no provocó este efecto.

Como resultado, la administración de xantohumol solubilizado según la invención mejoró la obesidad y la resistencia a la insulina inducidas por la WTD.

Además, la WTD originó un aumento del tamaño del hígado de los animales de ensayo, que se mostró tanto por medio de registros fotográficos de los órganos, que se extrajeron de los animales al final de la serie de ensayos (figura 2A), como por un aumento del peso del hígado (figura 2B). Además, una coloración clara del hígado indica una acumulación de grasa en el hígado (esteatosis) (figura 2A para la administración del vehículo y xantohumol nativo). La administración del solubilizado según la invención adicionalmente a la WTD condujo a que se anulara el aumento del peso del hígado casi por completo, es decir, se consiguió de nuevo el valor de partida (figura 2B).

Asimismo, la WTD condujo a un aumento del contenido en triglicéridos en el hígado. También la histología del hígado constató el hallazgo de hígado graso (esteatosis hepática). La administración del solubilizado de xantohumol según la invención junto con la WTD condujo a una reducción notable de la cantidad de triglicéridos en el hígado (figura 2C), que se mostró igualmente en estudios histológicos, en los que se observó solo una mínima esteatosis en comparación con el grupo control.

Los marcadores de una inflamación del hígado (expresión de la quimiocina proinflamatoria MCP-1 y de la citocina CXCL1) se elevaron significativamente mediante la WTD en comparación con el control (véanse las figuras 3A y 3B). La administración del solubilizado de xantohumol según la invención junto con la WTD condujo a un retroceso significativo del aumento de estos dos parámetros (véase la figura 3A).

Un análisis de qPCR cuantitativo de los hígados de los ratones alimentados con la WTD mostró una expresión elevada de la “alfa-actina del músculo liso” (a-SMA), una proteína de la musculatura lisa, (véase la figura 4A). La proteína a-SMA es un marcador establecido de astrocitos hepáticos activados (HSC), que desencadenan una cirrosis hepática. Un análisis inmunohistoquímico de la proteína a-SMA comprobó que la WTD origina una activación clara de HSC (figura 4B). Este hecho va acompañado de una expresión significativamente elevada del colágeno tipo 1 (COL1A1) en el hígado de ratones alimentados con WTD en comparación con el grupo control (figura 4C). El colágeno tipo 1 (COL1A1) es cuantitativa y cualitativamente la proteína de matriz extracelular más importante en la fibrosis hepática.

Cabe destacar que el tratamiento con el xantohumol solubilizado según la invención impide significativamente la expresión inducida por la WTD de a-SMA y del colágeno tipo 1, mientras que el xantohumol nativo apenas muestra efectos (figuras 4A, 4B y 4C).

Por lo tanto, el solubilizado según la invención es adecuado para reducir una inflamación del hígado, esteatosis y fibrosis ya desarrolladas.

Por tanto, estos hallazgos son particularmente sorprendentes, dado que la administración de xantohumol con el solubilizado según la invención se realizó en organismos ya dañados mediante la alimentación según la WTD realizada anteriormente. En sistemas biológicos o en relación con el estudio de principios activos en enfermedades es claramente más fácil detectar un efecto cuando el principio activo se administra desde el inicio junto con el agente o el mecanismo que induce la enfermedad, en este caso, la WTD. En el contexto de los estudios descritos anteriormente se realizó la administración del solubilizado según la invención, por el contrario, solo en caso de adiposidad ya manifestada o bien en caso de daños ya avanzados en el órgano, es decir, en fase de terapia del experimento.

Las dosificaciones para el ser humano, correspondientes a las dosis determinadas en ratas en otros ensayos con animales, se calcularon como se describe a continuación. La conversión de la dosificación para ratas en la dosificación para seres humanos, en cada caso, en mg por kg de peso corporal y día, se realiza según la ecuación

$$Dosificación_{Humano} = \frac{Dosificación_{Rata} \cdot 6}{37}$$

A continuación se explica un ejemplo de la administración de 5 mg de xantohumol:

≅ 5 mg de xantohumol/kg de peso corporal de rata

≅ 0,81 mg de xantohumol/kg de peso corporal de ser humano.

Basándose en un peso corporal de 70 kg resulta una dosis diaria para el ser humano de:

+xantohumol:

$$((5 \div 37) \times 6) \times 70 = 56,76 \text{ mg de xantohumol/ser humano/día}$$

Para la dosis diaria de un ser humano resulta la siguiente cantidad de solubilizado. El siguiente cálculo se realizó para un solubilizado de xantohumol al 10 %.

$$\text{Xantohumol: } 56,76 \text{ mg} \times 10 = 567,60 \text{ mg de solubilizado}$$

De esto resulta para el polisorbato:

$$567,60 \text{ mg de solubilizado} \times 0,75 = 425,70 \text{ mg de polisorbato en la cantidad total de solubilizado.}$$

Partiendo de un peso corporal de 70 kg y de la recomendación de la OMS de una ingesta diaria de 25 mg de polisorbato (= 1 750 mg de polisorbato/día), los solubilizados anteriormente descritos se encuentran todos dentro de la cantidad de ingesta diaria recomendada de la OMS.

En la Universidad de El Cairo en la facultad de farmacia en el Instituto de Farmacología se realizaron estudios por parte del Prof. Dr. M. T. Khayyal para determinar el efecto antiinflamatorio de la curcumina y de combinaciones de curcumina con xantohumol en cada caso en forma nativa o en forma solubilizada según la invención.

Se determinaron marcadores antiinflamatorios y la capacidad antioxidativa. Ratas Wistar hembras con un peso corporal entre 150 y 200 g se expusieron según "Pearson y col. (1956)" a la "artritis inducida por adyuvante". Se les administró a los animales a través de una inyección subplantar 0,1 ml de adyuvante de Freund (FCA) en el día 0 en la pata trasera derecha. Los animales se dividieron aleatoriamente en 12 grupos con en cada caso 8 animales. En el contexto de los estudios con respecto al solubilizado de xantohumol según la invención son interesantes los siguientes grupos:

El grupo 1 formaba el grupo control.

El grupo 2 recibió diclofenaco como principio activo de referencia en una dosificación de 3 mg/kg de peso corporal.

El grupo 7 recibió xantohumol nativo en una dosificación de 5 mg/kg de peso corporal y

el grupo 8 xantohumol solubilizado en la misma dosificación.

El grupo 12 recibió una mezcla de curcumina solubilizada y xantohumol solubilizado en cada caso en la misma dosificación.

Todos los extractos o solubilizados se administraron por vía oral una vez al día desde el día 0 hasta el día 21 después de la inoculación con el adyuvante. Después del día 21 se sacrificaron los animales y se prepararon muestras de suero y se almacenaron a -80 °C. Se midieron mieloperoxidasa (MPO), proteína C reactiva (PCR), la capacidad antioxidativa total (TAC) y las sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric acid reactive substances) (TBARS).

Los resultados de los estudios se explican a continuación por medio de las figuras 5 y 6 adjuntas.

En primer lugar, se estudiaron las repercusiones de la proteína C reactiva (PCR). La proteína C reactiva es un marcador específico de una actividad antiinflamatoria. El xantohumol solo tiene un efecto comparable al diclofenaco y mostró una actividad antiinflamatoria mejor en forma solubilizada en comparación con la forma nativa (figura 5).

La mieloperoxidasa (MPO) en plasma desempeña un papel principal como mediador proinflamatorio en la artritis reumatoide y es un indicador de la migración de granulocitos neutrófilos hacia el tejido afectado. Su concentración es elevada en pacientes con artritis reumatoide y origina estrés oxidativo. La forma nativa del propio xantohumol tenía solo un efecto bajo sobre la concentración de MPO en suero, mientras que la forma solubilizada de xantohumol casi es tan eficaz como el diclofenaco (figura 6).

El estrés oxidativo es uno de los factores principales que contribuyen en el caso de artritis reumatoide (RA) a la destrucción articular. Un aumento de la producción de las denominadas "especies de oxígeno reactivas, *reactive oxygen species* (ROS)" conduce a un suministro reducido de antioxidantes endógenos y da como resultado finalmente la destrucción de células. Los granulocitos neutrófilos, que se liberan en la articulación reumatoide, producen radicales libres de oxígeno que conducen a una formación elevada de peróxidos lipídicos que se muestran en un aumento en suero de TBARS. Por lo tanto, el aumento en el estado de antioxidantes, que se representa por un aumento en TAC, puede usarse como indicación de la protección contra el desarrollo de procesos inflamatorios degenerativos. Existe una relación inversa entre el nivel de TAC y el de TBARS, un alto nivel de la capacidad antioxidativa TAC se corresponde con una baja concentración de TBARS.

La siguiente tabla contiene datos con respecto al efecto de curcumina como comparación y de xantohumol en cuanto a la invención en forma nativa y solubilizada o bien proporcionado solo o en combinación con diclofenaco en una dosificación de 3 mg/kg de peso corporal una vez al día de 15 a más de 21 días con respecto a la capacidad antioxidativa TAC y las sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico TBARS en el suero de ratas artríticas (n=8). Las indicaciones son valores promedio $\pm$ error estándar SEM.

Grupo	TAC (nmol/microlitro)	TBARS (nmol/l)
Grupo control artrítico	57,26 $\pm$ 3,36	13,10 $\pm$ 0,39
Diclofenaco (3 mg/kg)	82,08 $\pm$ 2,96	7,93 $\pm$ 0,84
Xantohumol nativo (5 mg/kg)	63,71 $\pm$ 1,02	11,42 $\pm$ 1,16
Xantohumol solubilizado (5 mg/kg)	81,74 $\pm$ 1,71	7,47 $\pm$ 0,53

Grupo	TAC (nmol/microlitro)	TBARS (nmol/l)
Curcumina nativa (5 mg/kg) + xantohumol (5 mg/kg)	66,71 ± 1,27	11,74 ± 0,48
Curcumina solubilizada (5 mg/kg) + xantohumol (5 mg/kg)	82,22 ± 1,53	7,90 ± 0,59

El xantohumol solubilizado según la invención solo era, a este respecto, casi igual de efectivo que diclofenaco con la reducción de TBARS y el aumento de la TAC en suero de las ratas artríticas, como muestran los datos en la tabla.

Mediante los tamaños de partícula pequeños medidos se consigue ventajosamente la formación de un líquido transparente, en particular, para la percepción del ojo humano.

La claridad del solubilizado también puede representarse por su baja turbidez. Para ello, se aplica la siguiente hipótesis de trabajo: cuanto más transparente sea una dilución acuosa de un solubilizado u otra formulación de xantohumol, en particular, en condiciones fisiológicas de un tránsito gástrico, por tanto, con un valor de pH de 1,1 y una temperatura de 37 °C, mejor es su solubilización. Cuanto mejor sea la solubilización, mejor es la biodisponibilidad de los principios activos o del producto que los contiene.

Esta biodisponibilidad puede interpretarse ya en la turbidez especialmente baja del solubilizado, que puede entenderse como un tipo de parámetro para la biodisponibilidad.

La formulación según la invención transparente y soluble en agua de manera completamente estable presenta una transparencia estable de manera independiente del pH, sin coadyuvantes como en cápsulas de gelatina blanda y dura, en cápsulas (duras y/o blandas) sin gelatina y en productos finales líquidos a base de agua. Los productos con transparencia y solubilidad en agua de este tipo se investigan por parte de la industria pertinente de manera apremiante para productos innovadores como relleno para cápsulas. Una formulación de xantohumol, que cumpla dichos requerimientos, aún no existe hasta ahora según el conocimiento de la parte inventora.

Como consecuencia de la formulación según la invención en un solubilizado con micelas muy pequeñas, estables y resistentes a los jugos gástricos, la invención crea un solubilizado de xantohumol para su uso como suplemento alimenticio y/o fármaco, en particular, para su uso como suplemento alimenticio y/o fármaco con efecto antiinflamatorio.

Es evidente para el experto, que la invención no está limitada a los ejemplos descritos anteriormente, sino que más bien puede variarse de diversas maneras. En particular, las características de los ejemplos representados individualmente también pueden combinarse entre sí o pueden intercambiarse una por otra.

REIVINDICACIONES

1. Solubilizado anhidro que está constituido por

5 xantohumul en una proporción inferior o igual al 35 % en peso, preferiblemente, inferior o igual al 15 % en peso, de manera especialmente preferible, del 2 % en peso al 12 % en peso y al menos un emulsionante con un valor de HLB en el intervalo entre 13 y 18, que está seleccionado, en particular, del grupo que comprende polisorbato 80, polisorbato 20, ésteres sacáridos de ácidos grasos alimentarios (E 473) así como fosfolípidos, en particular, lecitina y mezclas de al menos dos de los emulsionantes mencionados,

10 y hasta el 35 % en peso, preferiblemente, hasta el 20 % en peso, de manera especialmente preferible, hasta el 15 % en peso de etanol y opcionalmente hasta el 25 % en peso, preferiblemente, hasta el 10 % en peso de glicerol.

- 15 2. Solubilizado, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el solubilizado contiene como fuente de xantohumul un extracto etanólico de las resinas duras del lúpulo, en donde xantohumul se encuentra en este extracto en una concentración en el intervalo entre el 60 % en peso y el 95 % en peso, preferiblemente, en una concentración en el intervalo del 65 % en peso al 85 % en peso.

- 20 3. Solubilizado, según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que**
- 25 el emulsionante es polisorbato 80 o polisorbato 20 o una mezcla de polisorbato 20 y polisorbato 80, o por que el emulsionante es un éster sacárido de un ácido graso alimentario o una mezcla de al menos dos ésteres sacáridos de ácidos grasos alimentarios,
- 30 o por que el emulsionante es una mezcla de polisorbato 80 o polisorbato 20, o una mezcla de polisorbato 80 y polisorbato 20 con al menos un éster sacárido de un ácido graso alimentario, o por que el emulsionante es una mezcla al menos de un fosfolípido, en particular, lecitina, con al menos un éster sacárido de un ácido graso alimentario.

- 35 4. Solubilizado, según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la relación de emulsionante, en particular, de polisorbato 80, con respecto a xantohumul se encuentra en el intervalo entre 30:1 y 3:1, preferiblemente, en el intervalo entre 25:1 y 5:1, preferiblemente, en el intervalo entre 9,8:1 y 6,6:1.

- 40 5. Solubilizado, según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la proporción de emulsionante, en particular, la proporción de polisorbato se encuentra en al menos el 45 % en peso, preferiblemente, en el intervalo entre el 60 % en peso y el 95 % en peso, de manera especialmente preferible, en el intervalo entre el 73 % en peso y el 90 % en peso.

- 45 6. Solubilizado, según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la distribución del diámetro de las micelas en una dilución del solubilizado con agua destilada en la relación 1:500 con un pH 1,1 y 37 °C alcanza de aproximadamente $d_{10}=70$ nm a aproximadamente $d_{90}=160$ nm.

- 50 7. Solubilizado, según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la turbidez del solubilizado es inferior a 100 FNU, preferiblemente, inferior a 50 FNU, medida mediante medición de luz dispersa con luz infrarroja según las especificaciones de la norma ISO 7027 con una dilución del solubilizado en la relación 1:50 en agua con un pH 1,1 y a 37 °C.

- 55 8. Cápsula rellena con un solubilizado anhidro, según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la cápsula está formada como cápsula de gelatina blanda o cápsula de gelatina dura o como cápsula blanda, sin gelatina o como cápsula dura, sin gelatina, en particular, como cápsula de celulosa.

- 60 9. Fluido que contiene un solubilizado anhidro, según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** el fluido está seleccionado del grupo que comprende alimentos, productos cosméticos y productos farmacéuticos.

10. Procedimiento para la producción de un solubilizado, según una de las reivindicaciones 1 a 7, con las siguientes etapas

65 a) disponer al menos un emulsionante con un valor de HLB en el intervalo entre 13 y 18, que está seleccionado, en particular, del grupo que comprende polisorbato 80, polisorbato 20, ésteres

- 5 sacáridos de ácidos grasos alimentarios (E 473) y fosfolípidos, en particular, lecitina, y mezclas de al menos dos de los emulsionantes mencionados,
 b)añadir etanol,
 c)calentar a una temperatura de hasta 85 °C, preferiblemente, hasta 80 °C, mezclando por ejemplo mediante agitación,
 d)añadir una extracción etanólica de las resinas duras del lúpulo mezclando por ejemplo mediante agitación,
- 10 en donde en la etapa d) se realiza un calentamiento a una temperatura en el intervalo de 81 °C a 90 °C, de manera especialmente preferible, a una temperatura en el intervalo de 83 °C y 87 °C.
11. Procedimiento según la reivindicación 10
- 15 en donde antes de la etapa b) se realiza una etapa de b1) solución del extracto etanólico de las resinas duras del lúpulo en etanol por calentamiento a una temperatura en el intervalo de 40 °C a 62 °C, preferiblemente, a una temperatura en el intervalo de 45 °C a 57 °C, de manera especialmente preferible, a una temperatura en el intervalo de 48 °C y 52 °C.
- 20 12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en donde en la etapa c) se realiza un calentamiento a una temperatura más baja en el intervalo de 40 °C a 62 °C, preferiblemente, a una temperatura en el intervalo de 45 °C a 57 °C, de manera especialmente preferible, a una temperatura en el intervalo de 48 °C y 52 °C.
- 25 13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en donde en la etapa b) se realiza una adición de un fosfolípido, en particular, una adición de lecitina, junto con etanol.
- 30 14. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 11 a 13, en donde en la etapa b) se realiza una adición de glicerol junto con etanol.

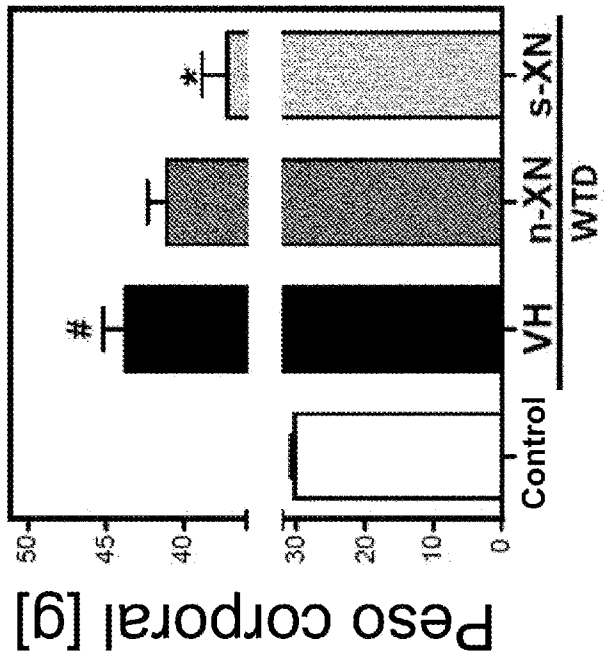


Figura 1B

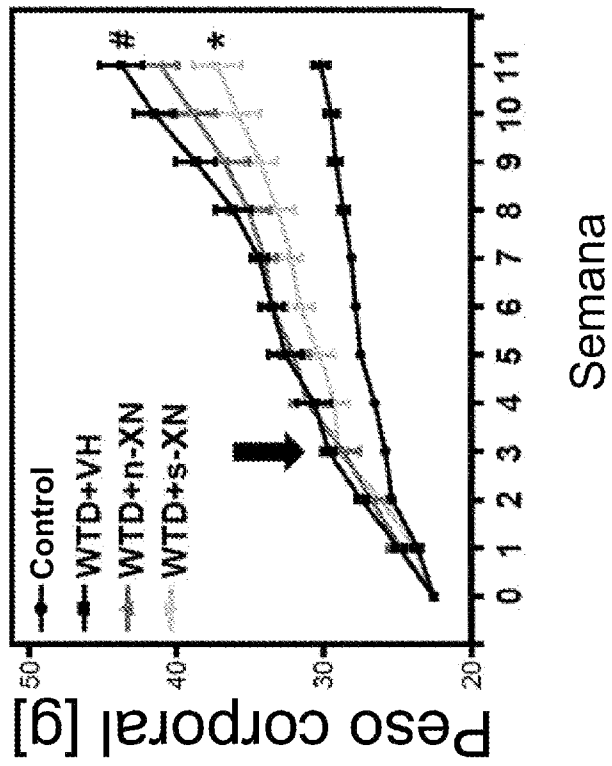


Figura 1A

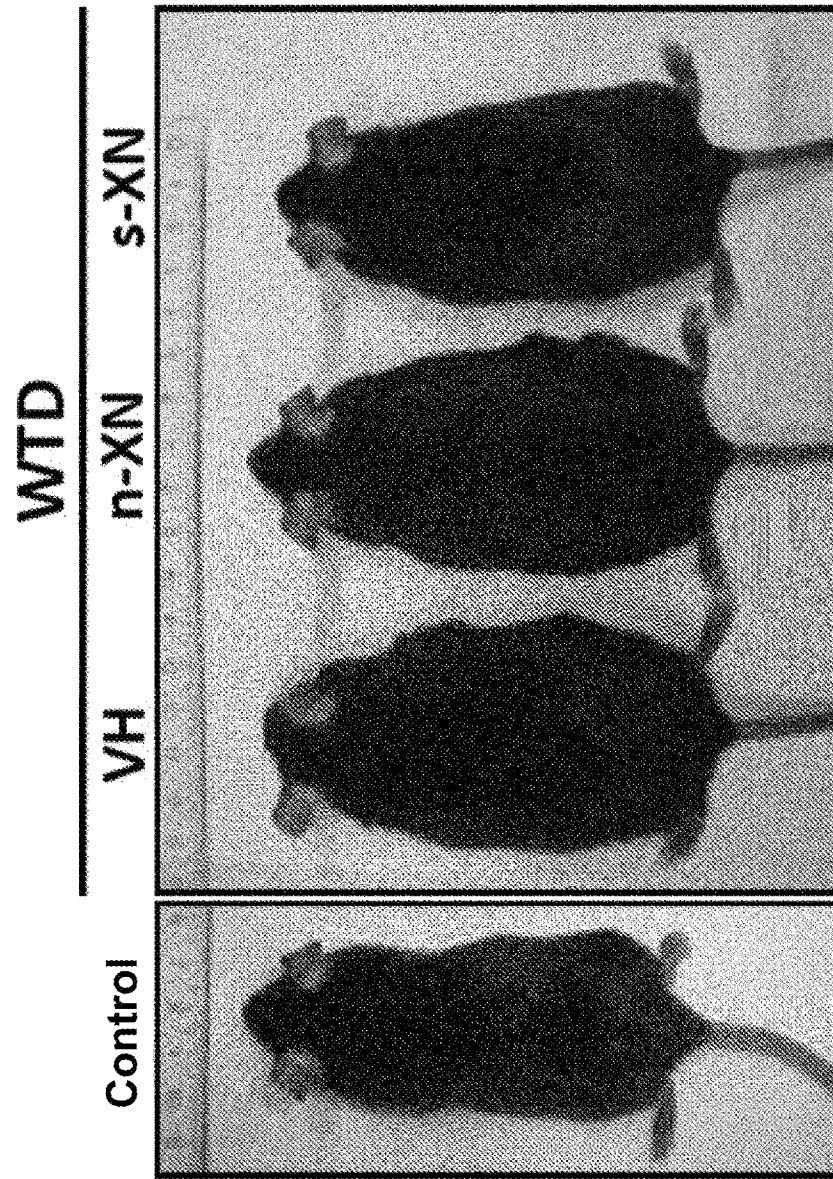


Figura 1C

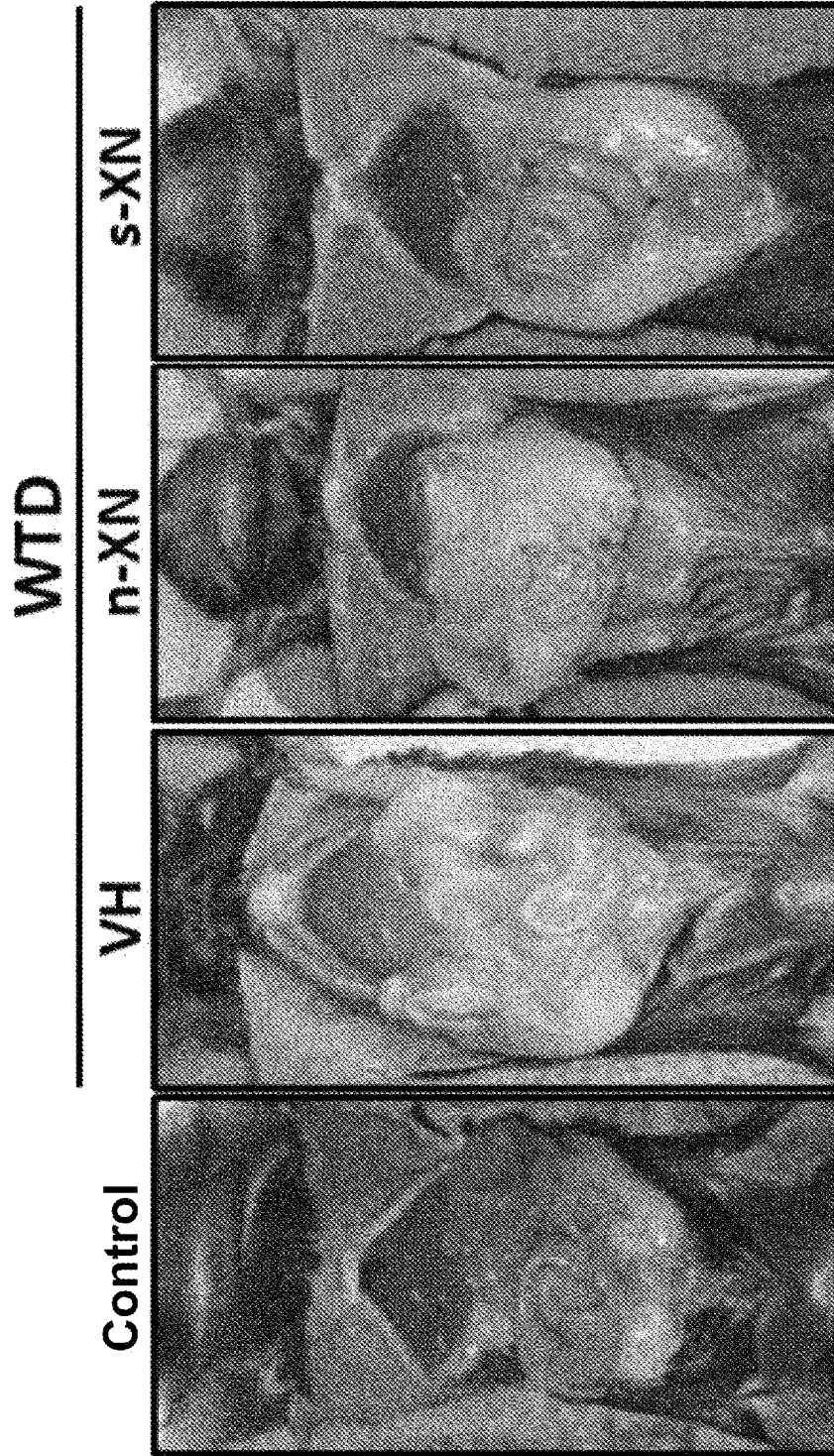


Figura 1D

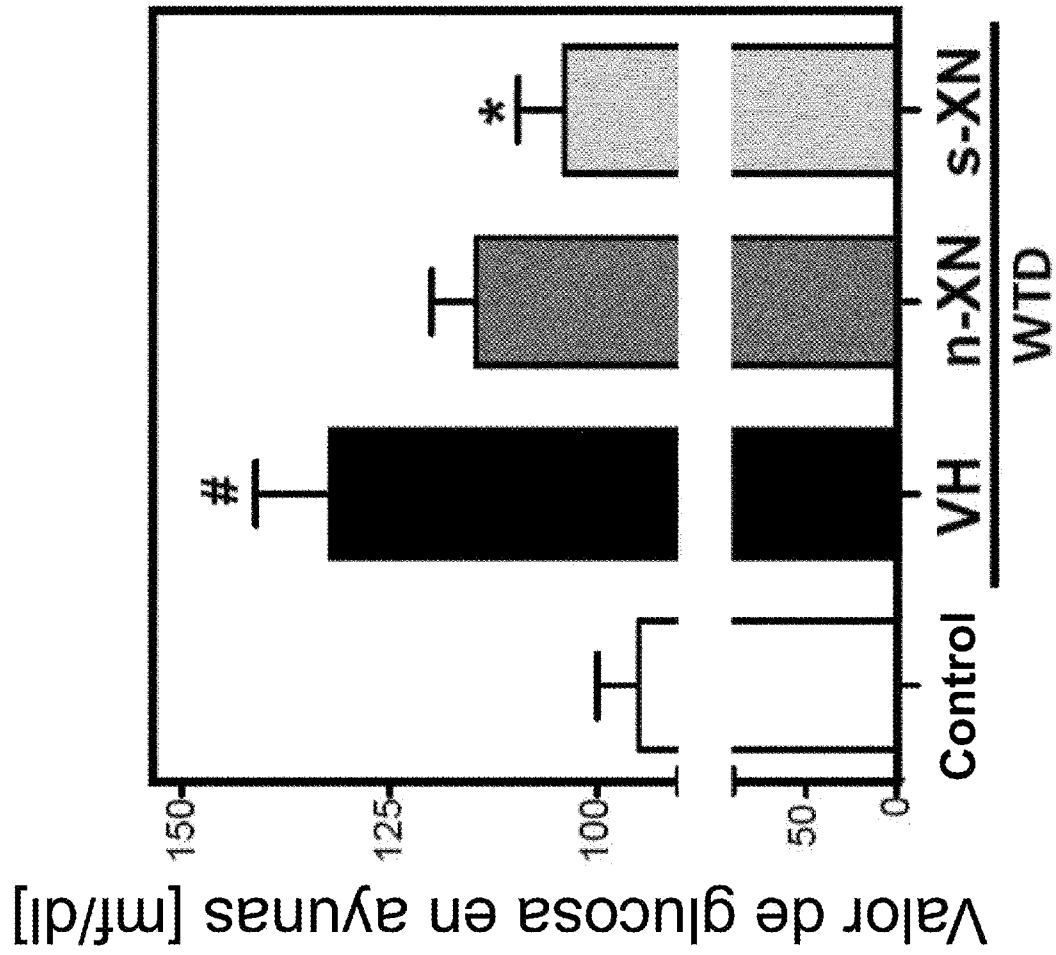


Figura 1E

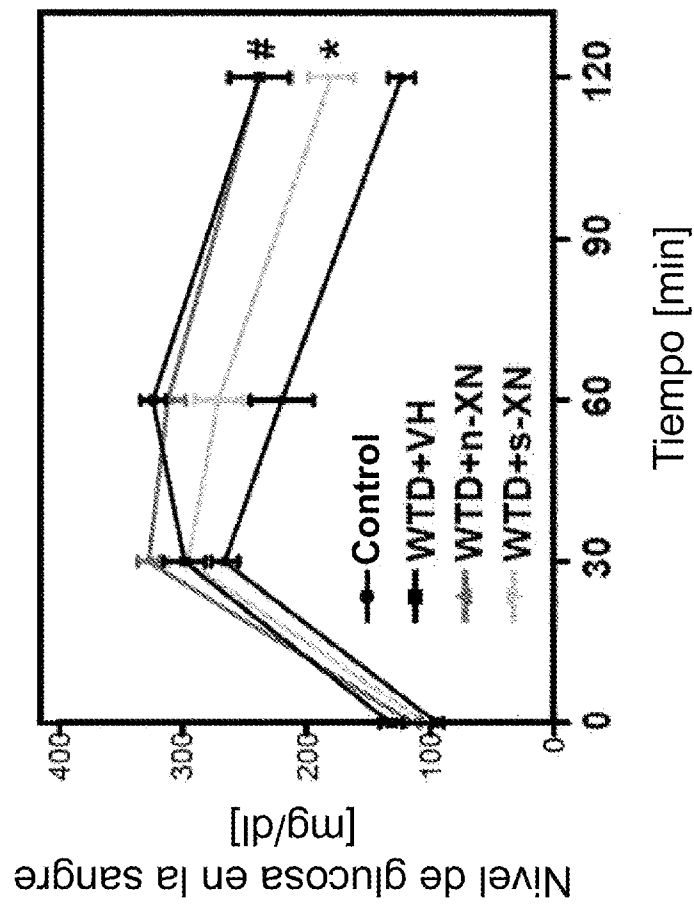
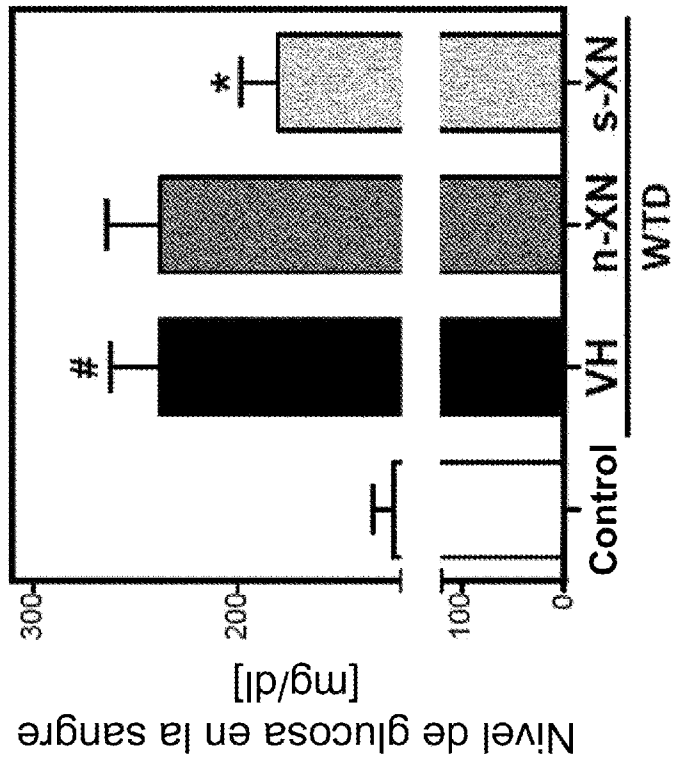


Figura 1F

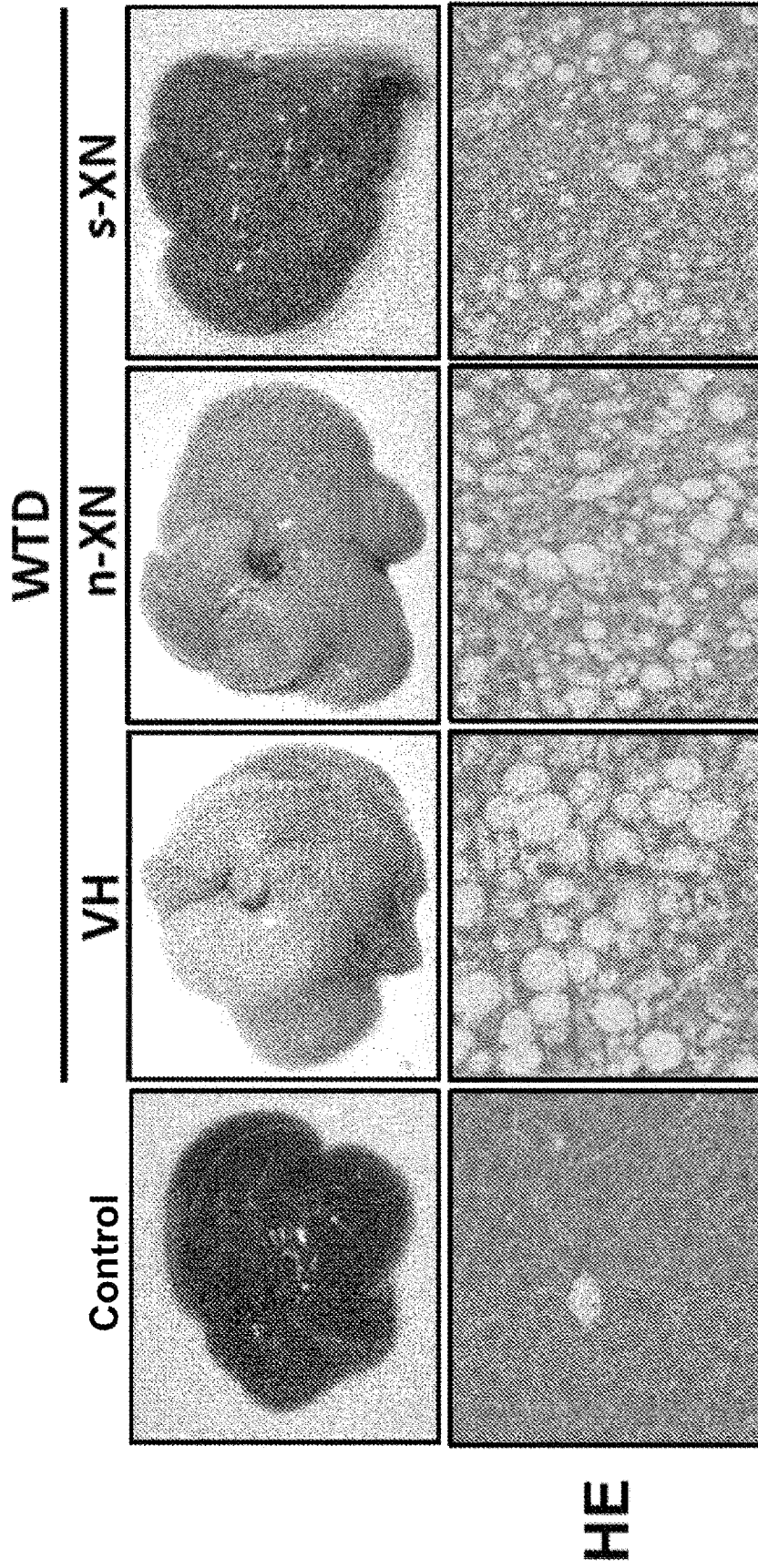


Figura 2A

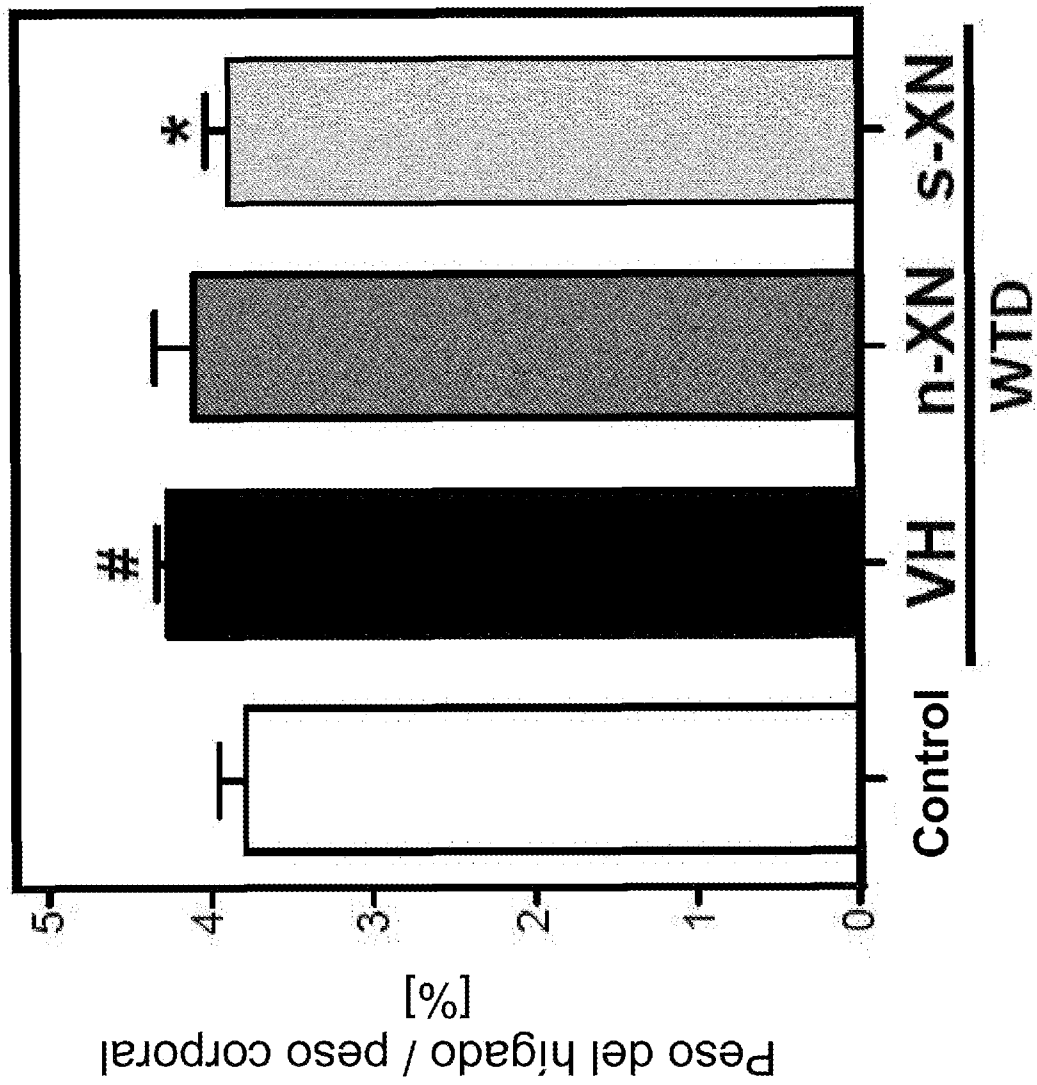


Figura 2B

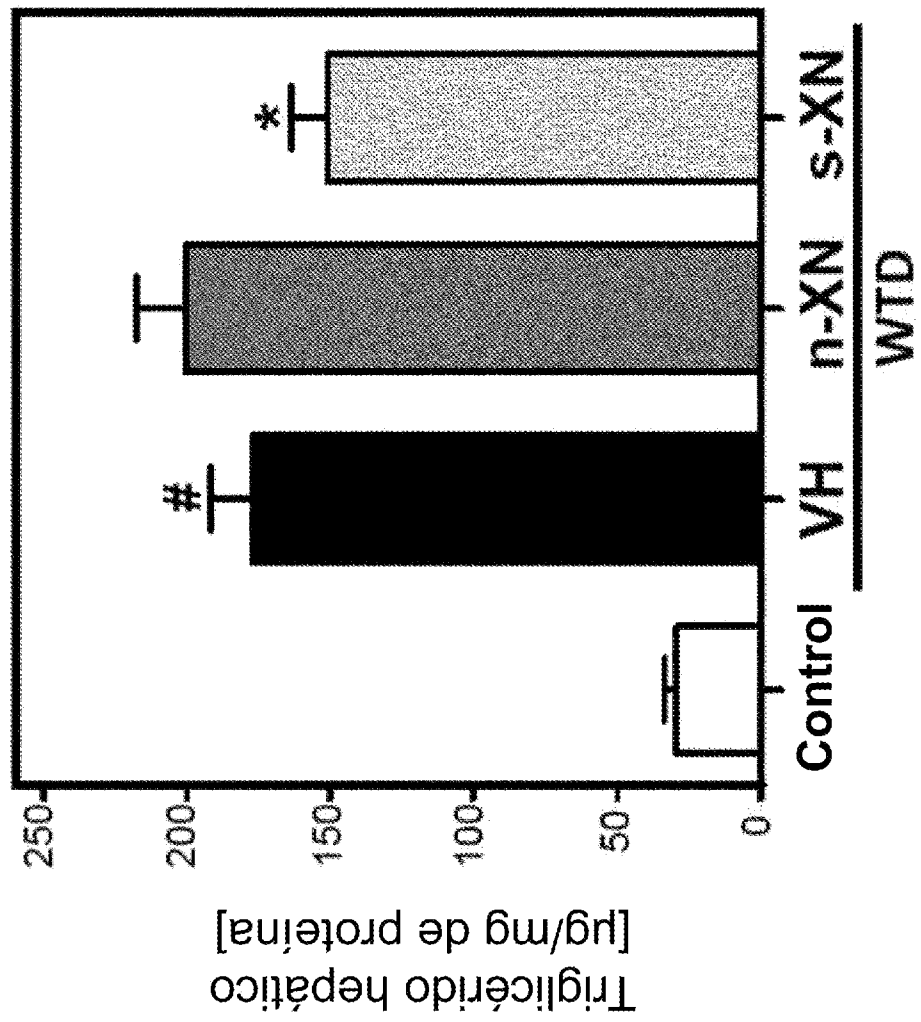


Figura 2C

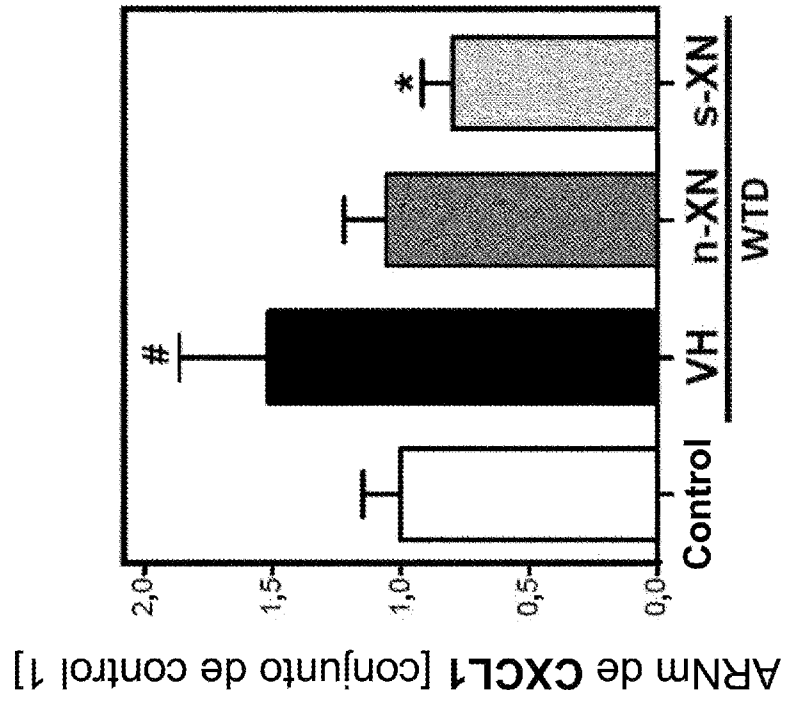


Figura 3B

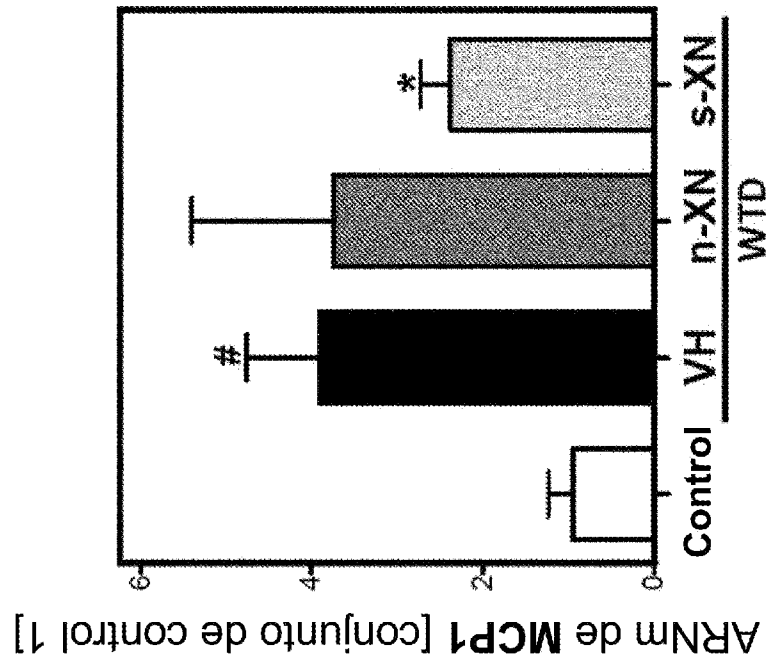


Figura 3A

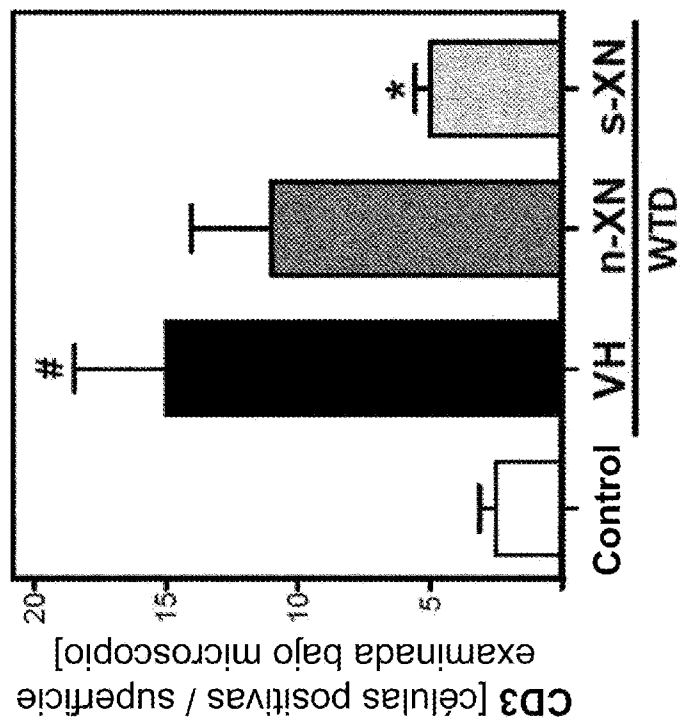
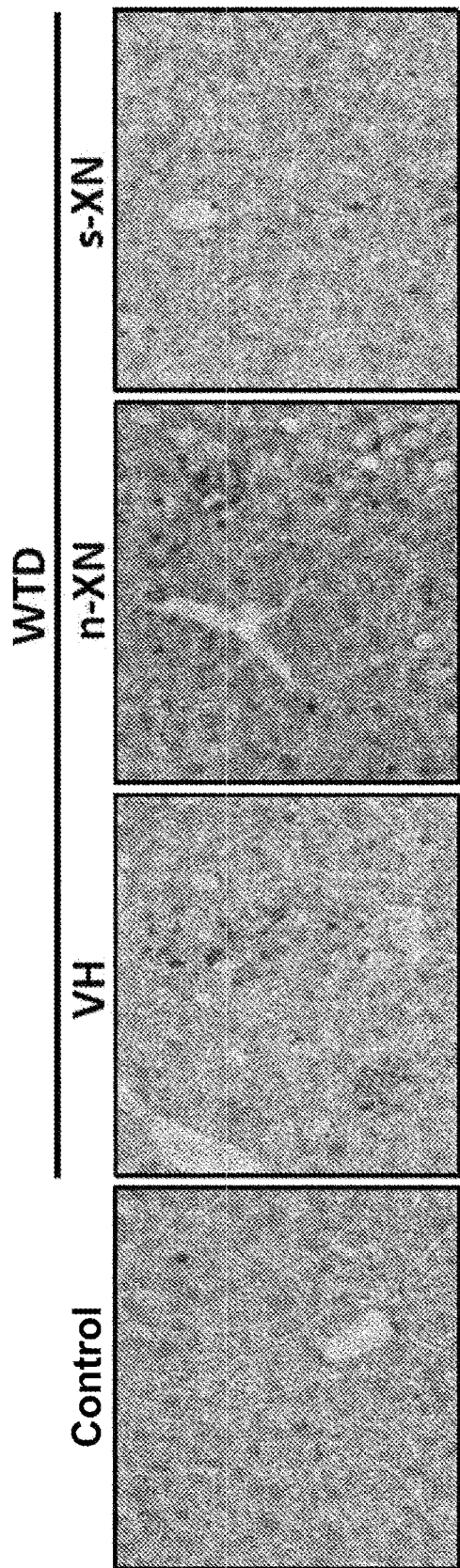


Figura 3C

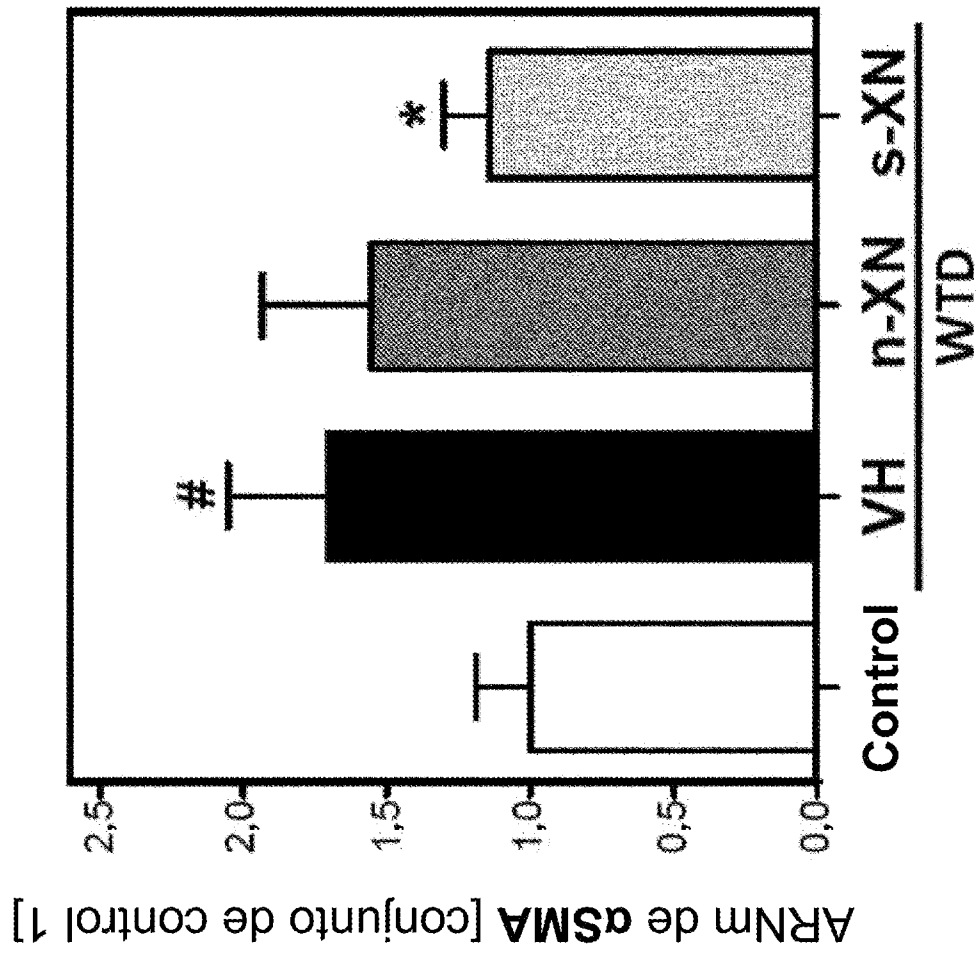


Figura 4A

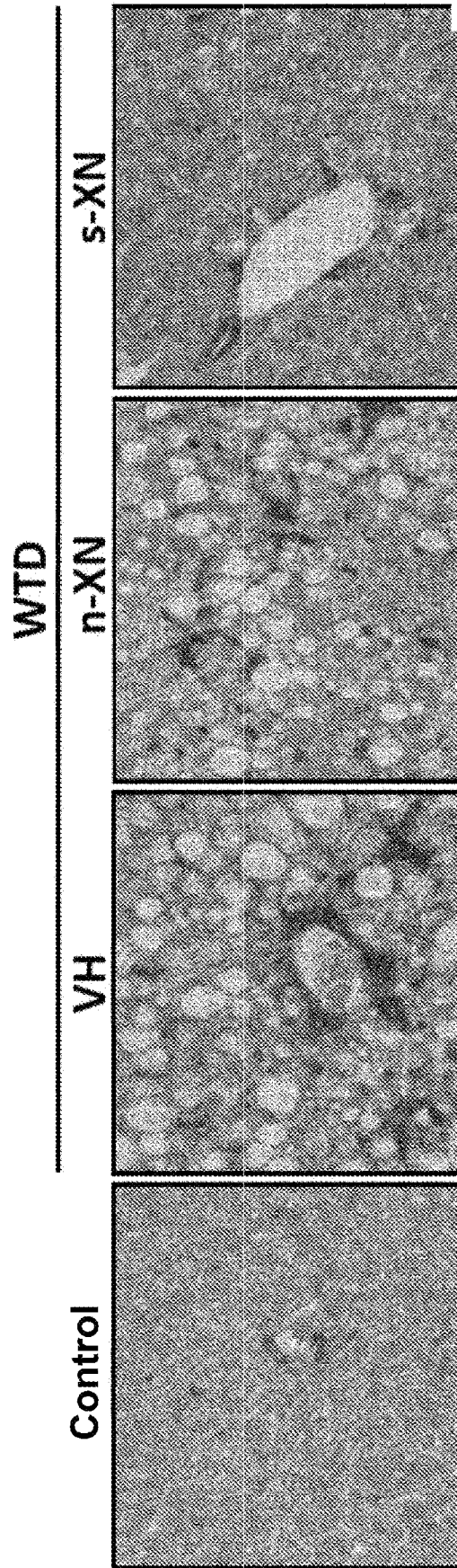


Figura 4B

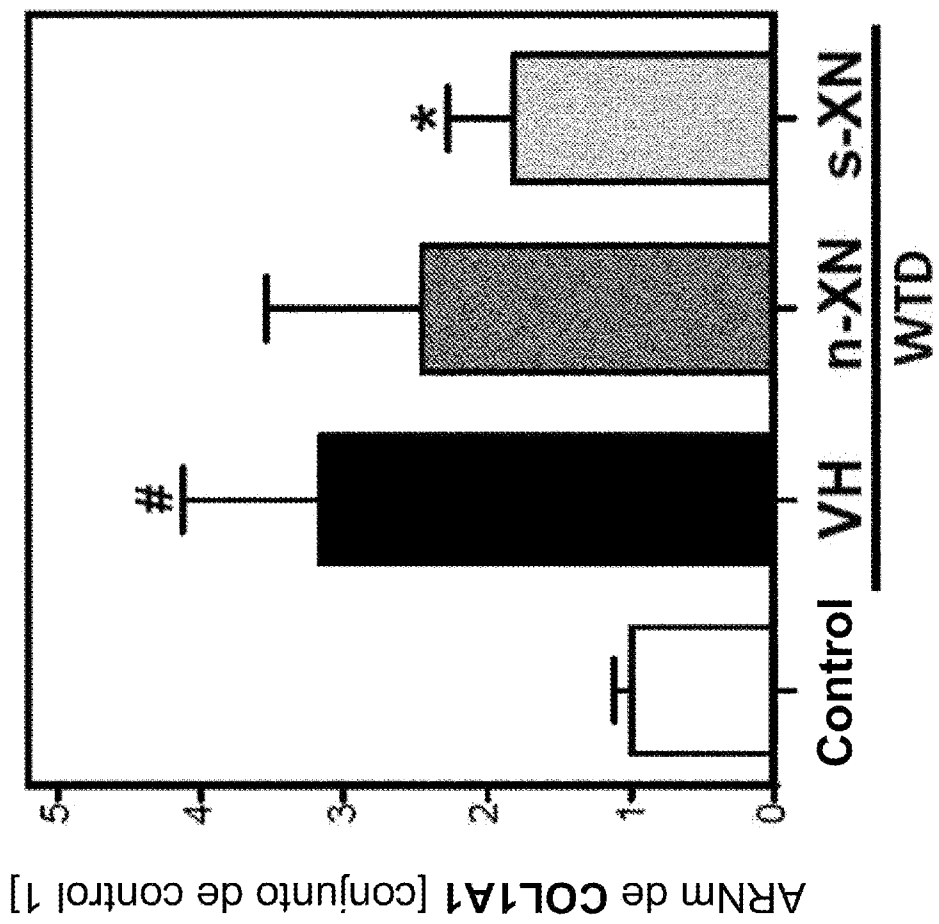


Figura 4C

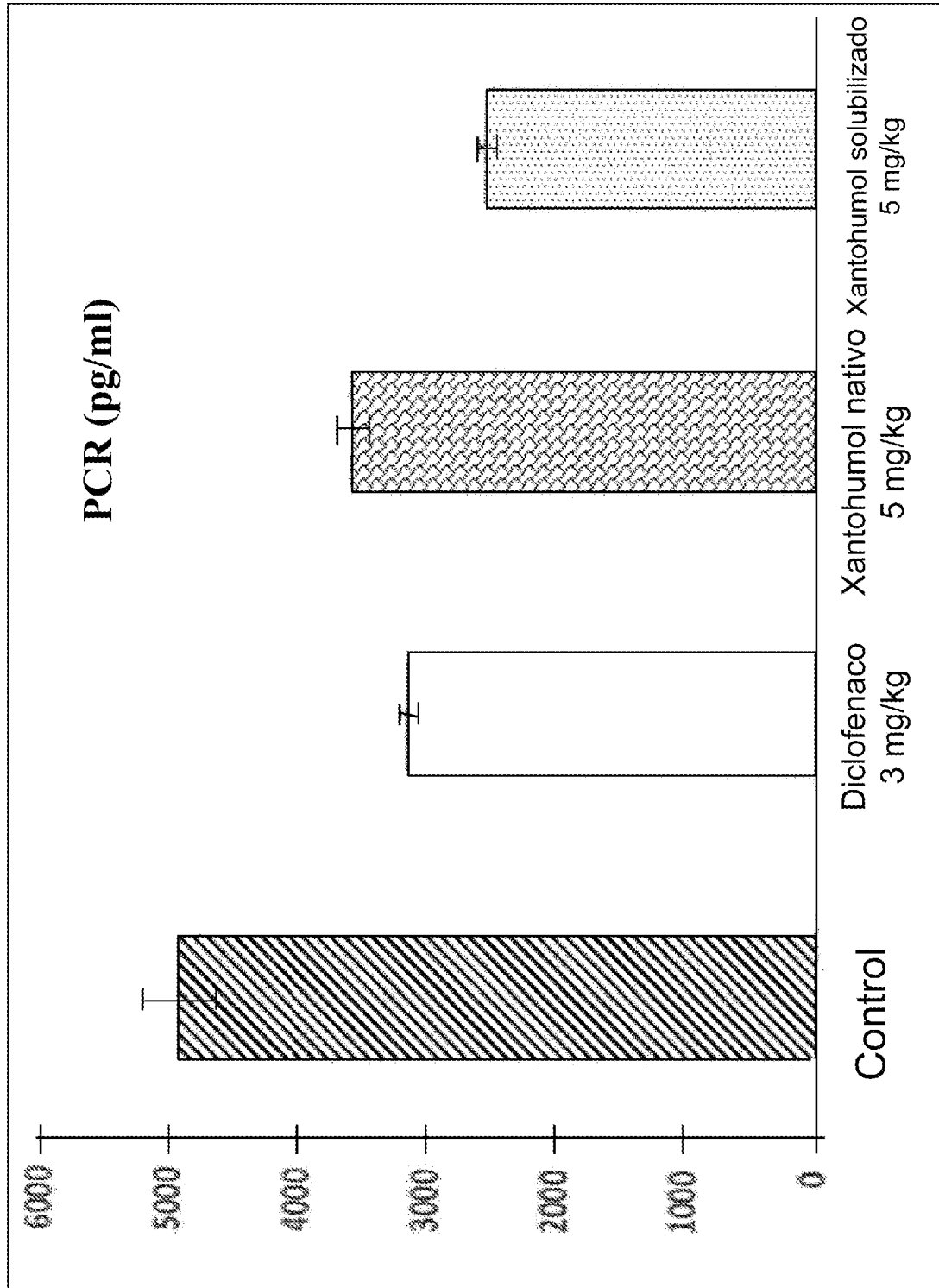


Figura 5

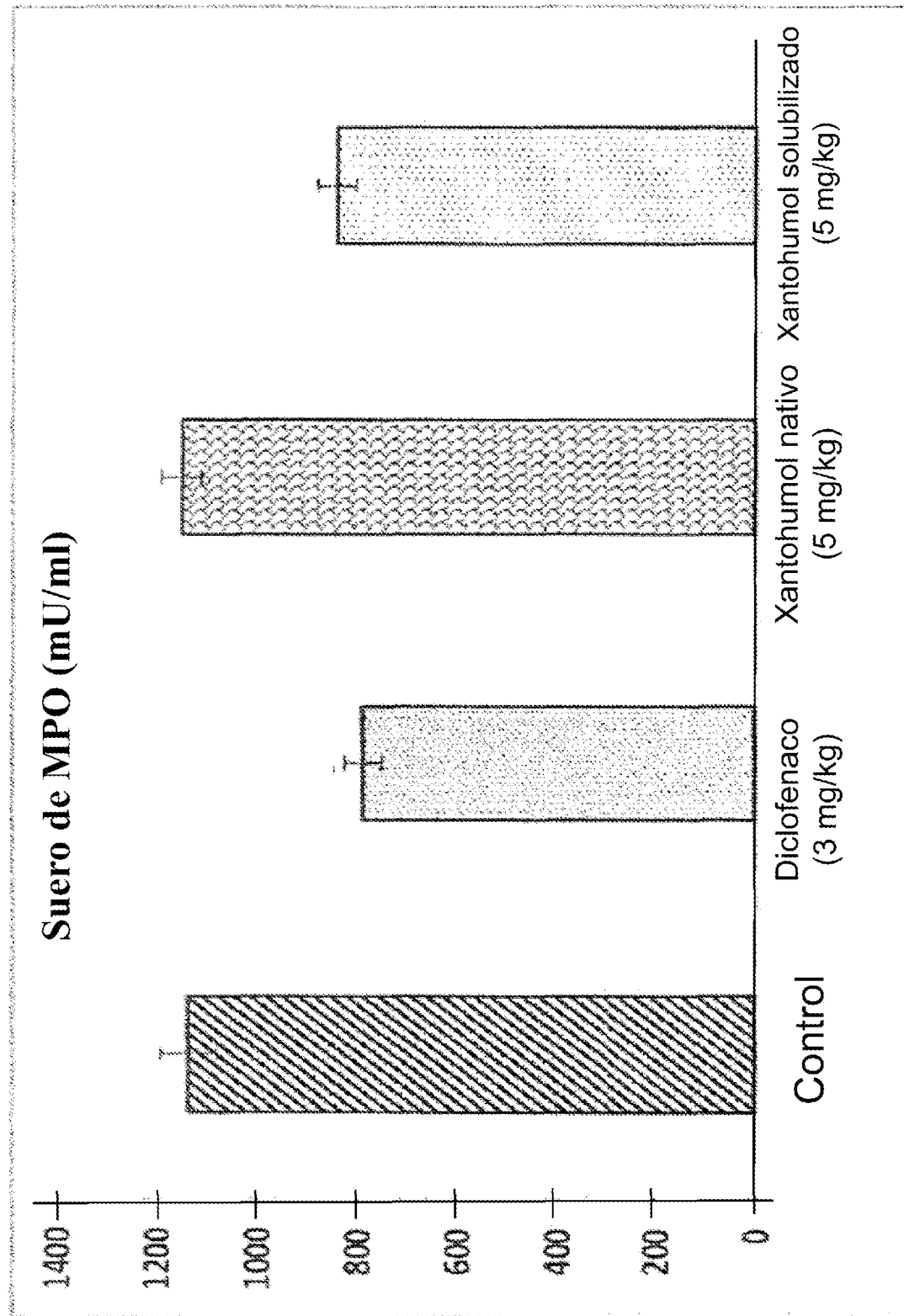


Figura 6