



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 330 084**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/12 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01987665 .5**

(96) Fecha de presentación : **18.10.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1328263**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2003**

(54) Título: **Procedimiento para elaborar y método de uso de tetrahidrocurcuminoides para regular episodios fisiológicos y patológicos en las células de la piel y las mucosas.**

(30) Prioridad: **19.10.2000 US 241364 P**
09.10.2001 US 972150

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.12.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.12.2009

(73) Titular/es: **Sabinsa Corporation**
Unit 6, 121 Ethel Road West
Piscataway, New Jersey 08854, US

(72) Inventor/es: **Majeed, Muhammed y**
Badmaev, Vladimir

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 330 084 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para elaborar y método de uso de tetrahidrocurcuminoides para regular episodios fisiológicos y patológicos en las células de la piel y las mucosas.

Antecedentes de la invención

Una célula corporal debe en gran parte su funcionamiento a su citoesqueleto, el armazón estructural de la célula. El citoesqueleto está formado por componentes del citoplasma que mantienen la conformación de la célula, estabilizan las uniones de la célula con células vecinas y facilitan funciones celulares especializadas como endocitosis, exocitosis y movilidad celular. El citoesqueleto incluye varias estructuras filamentosas como microtúbulos, microfilamentos, filamentos intermedios y red microtrabecular. Las proteínas que participan en la formación de un citoesqueleto, especialmente proteínas asociadas con los microtúbulos (MAPS, por sus siglas en inglés) después de ser fabricadas por la célula, están adaptadas adicionalmente a la función del citoesqueleto en un proceso llamado modificación postraduccional o reticulación. Este proceso de reticulación de proteínas es esencial para la estabilización del citoesqueleto, el episodio necesario para mantener la homeostasis celular, los procesos fisiológicos y el desarrollo y la maduración de las células.

La modificación postraduccional de proteínas implica varias reacciones químicas. La fosforilación de proteínas ejemplifica uno de los mecanismos más comunes de modificación postraduccional de proteínas celulares. Otros ejemplos incluyen metilesterificación de proteínas, ribosilación de ADP, glicosilación de proteínas, acetilación de histonas, formación de hipusina y reacciones catalizadas por transglutaminasas.

El potencial eléctrico de una célula es un aspecto de la fisiología celular importante para la comprensión del mecanismo de la invención. El potencial eléctrico de una célula se mantiene mediante un equilibrio complejo entre moléculas cargadas negativamente y positivamente que da como resultado un potencial de reposo fisiológico dentro de la célula de aproximadamente -70 mV. Este valor es indicativo del bienestar de la célula. Por otra parte, la incapacidad de una célula para mantener un potencial de reposo óptimo se produce en condiciones patológicas, por ej. ataques físicos o químicos, un proceso de enfermedad y el uso y el desgaste debidos al envejecimiento. Un potencial de reposo óptimo conduce a los procesos fisiológicos, incluyendo modificación postraduccional de proteínas y reticulación. También sigue siendo cierto que la reticulación fisiológica intacta de proteínas es indicativa de una capacidad de la célula para mantener un potencial eléctrico de reposo óptimo.

Efectos positivos de la reticulación

La reticulación de proteínas, como se ha mencionado previamente, es una consecuencia de la modificación postraduccional de proteínas. Algunas de las reticulaciones más comunes identificadas en las proteínas que forman el citoesqueleto son N-ε-(γ-glutamil)lisina y N,N-bis-(γ-glutamil)poliamina. La formación de estos dos tipos de reticulaciones está facilitada por la actividad catalítica de un grupo de enzimas conocidas como transglutaminasas. Una de las transglutaminasas bien conocidas del cuerpo es el Factor proteínico de coagulación XIII. Este Factor provoca la reticulación de la fibrina, que actúa como un agente estabilizante durante la formación de coágulos de sangre. Este tipo de modificación es un ejemplo de un mecanismo de salvamento basado en la reticulación de proteínas, que previene la exsanguinación en un corte o una herida.

Las transglutaminasas son responsables de facilitar un proceso fisiológico de reticulación de proteínas, que bajo condiciones normales conduce a la diferenciación celular, así, la célula es capaz de cumplir su propósito, por ej. una célula secretora de moco, una célula fagocítica, una célula epitelial y tegumentaria que protege la estructura tisular. La actividad de las transglutaminasas, o su ausencia, representa un papel crítico en la diferenciación de células cancerosas, especialmente el cáncer de piel melanoma. El melanoma es un cáncer que se extiende rápidamente que consiste en células cutáneas no diferenciadas, y el grado de diferenciación celular escasa se correlaciona bien con la actividad suprimida de la transglutaminasa. Por otra parte, la inducción experimental de la actividad de transglutaminasa condujo a resultados prometedores en el frenado o la inversión del avance del melanoma. Ejemplos de inductores de transglutaminasas son el ácido retinoico y las metilxantinas. Parece que el potencial terapéutico de los retinoides en el melanoma está relacionado con su capacidad para inactivar transglutaminasas intracelulares.

Reticulación perjudicial

Sin embargo, la reticulación de proteínas intracelulares no siempre es un episodio positivo. Cuando una reticulación aleatoria y masiva se precipita por un estímulo no fisiológico violento, se produce un envejecimiento acelerado de la célula. Debido a la naturaleza de la reticulación aleatoria, que desafía al propósito de la organización y la diferenciación celular, esto puede conducir no solo a envejecimiento y muerte celular prematuros, sino que también puede conducir a una patología incluyendo una enfermedad maligna. Por ejemplo, los radicales libres generados por UVA en células cutáneas pueden provocar la reticulación prematura de proteínas y la liberación de enzimas proteolíticas. Este último episodio conduce a la destrucción del citoesqueleto y al deterioro rápido de la organización celular que compromete el funcionamiento celular.

Es de especial interés mencionar en la presente memoria el término lipofusina, apodada "el pigmento del envejecimiento" o "manchas hepáticas", que se presenta en la epidermis y las membranas mucosas probablemente como

resultado de un metabolismo celular y sistémico interrumpido. Se ha mostrado que la lipofuscina resulta de la degeneración oxidativa de las mitocondrias y/o los lisosomas en las células. Se postula que la lipofuscina es un resultado de un error metabólico que da como resultado un hipoanabolismo combinado con hipercatabolismo. Se postula en la presente memoria que la formación de lipofuscina es en parte una manifestación del proceso interrumpido de modificación de proteínas postraduccional, y que este proceso se intensifica con cualquier proceso sistémico de enfermedad, incluyendo el proceso de envejecimiento.

Técnica relacionada

Según se menciona previamente, las transglutaminasas son responsables de facilitar el proceso fisiológico de reticulación de proteínas, que bajo condiciones normales conduce a la diferenciación, la maduración y el envejecimiento oportuno de las células. Existe una evidencia considerable de que la actividad intracelular de transglutaminasas puede inhibirse en una cierta patología, por ejemplo una enfermedad maligna, por ej. un melanoma. Parece que el potencial terapéutico de inductores de transglutaminasas como retinoides y metilxantinas en el melanoma está relacionado con su capacidad para activar transglutaminasas intracelulares. Esto, a su vez, conduciría a la diferenciación de las células, que en la práctica clínica conduciría a un frenado del proceso de enfermedad debido a una disminución en el número de células malignas no diferenciadas.

El papel de los curcuminoides, compuestos fenólicos amarillos derivados de raíces de cúrcuma (*Curcuma longa*, fam. Zingiberaceae), como antioxidantes tópicos se ha conocido tradicionalmente en Asia y recientemente se ha validado en experimentos de laboratorio. Se presenta que los curcuminoides protegen a los queratinocitos humanos normales de la lesión por hipoxantina/xantina oxidasa en estudios *in vitro*, y pueden proteger la piel contra una amplia gama de factores físicos, químicos y biológicos que lesionan la piel¹. Los radicales libres sobre la superficie de la piel, generados a través de la exposición a radiación ultravioleta, especialmente los rayos UVB, productos químicos u otros factores de estrés ambiental, catalizan el envejecimiento de la piel. Los curcuminoides evitan la formación de radicales libres y eliminan radicales libres en sistemas biológicos. Esta acción combinada se describió previamente como un mecanismo bioprotector que protege la integridad de la célula, por ej. una célula cutánea, viva. Los efectos antioxidantes de los curcuminoides combinados con sus efectos inhibidores conocidos sobre la ciclooxigenasa 2 (Cox-2) los hacen útiles como ingredientes en formulaciones antienvjecimiento y en formulaciones tópicas diseñadas para mantener la salud y la integridad generales de la piel. También se ha encontrado que los curcuminoides inhiben la actividad de la tirosinasa, una enzima que participa en la melanogénesis, evitando de ese modo la formación de melanina con el aclaramiento resultante del tono de la piel².

Los tetrahidrocurcuminoides (THC) son compuestos libres de color derivados de los curcuminoides, los compuestos amarillos originarios de los THC, en el proceso de hidrogenación. El proceso de hidrogenación de curcuminoides también puede producirse naturalmente en el tracto gastrointestinal³. Las propiedades biológicas de los tetrahidrocurcuminoides similares a las de los curcuminoides combinadas con la falta de color amarillo los hacen útiles en aplicaciones alimentarias y cosméticas acromáticas que actualmente emplean antioxidantes sintéticos convencionales.

Como los curcuminoides, los THC también muestran una acción antioxidante significativa en un número de estudios *in vitro* y preclínicos⁴⁻⁹. Los THC se valoran como los metabolitos definitivos de los curcuminoides *in vivo*. Varios estudios independientes validaron los efectos antioxidantes significativos de los tetrahidrocurcuminoides y la protección de la piel contra los radicales libres y los rayos UVB.

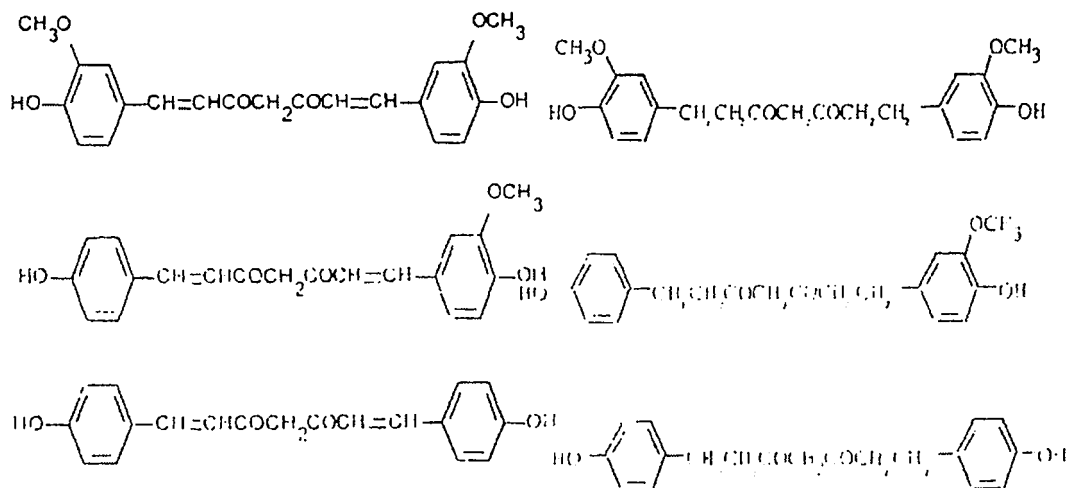
Los derivados de curcumina, incluyendo tetrahidrocurcumina y curcuminoides, son bien reconocidos en la bibliografía como un grupo de antioxidantes fenólicos (Majeed *et al.* Curcuminoid book). Majeed *et al.*, Patente de EE. UU. N° 5.861.415, estableció que la combinación de curcuminoides presentes en la naturaleza aislados de raíz de cúrcuma, es decir, curcumina, desmetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina, producen una amplia gama de protección antioxidante descrita como acción bioprotectora. La acción bioprotectora, caracterizada por la prevención de la formación de radicales libres y la intervención en la eliminación de radicales libres, es ejercida por la tetrahidrocurcumina o los tetrahidrocurcuminoides (THC) así como la curcumina o los curcuminoides (Majeed *et al.*, Tumeric and the Healing Curcuminoids, Keats Publications 1996 y Majeed *et al.*, Curcuminoids Antioxidant Phytonutrients, NutriScience Publishers 1995). Sin embargo, la tetrahidrocurcumina o los tetrahidrocurcuminoides muestran propiedades de eliminación de radicales libres superiores, en comparación con la curcumina o los curcuminoides (Majeed *et al.* Curcuminoid book). Otra ventaja de los tetrahidrocurcuminoides es que no son curcuminoides tan altamente coloreados y así pueden aplicarse tópicamente sin manchar significativamente.

Recientemente, se ha encontrado que la curcumina pero no la tetrahidrocurcumina tiene un efecto protector sobre la reticulación de colágeno en ratas diabéticas. (Sajithlal GB, Chithra P, Chandrakasan G., Biochem Pharmacol, 15 de diciembre de 1998; 56(12):1607-14). Sin embargo, el efecto antirreticulación de la curcumina se alcanzaba con una dosis oral muy alta del compuesto (200 mg/kg de peso corporal). También se apreciaba que el efecto preventivo de la curcumina sobre la reticulación avanzada de colágeno era más pronunciado que su efecto terapéutico. Los autores de este estudio explicaban que el mecanismo antirreticulación de la curcumina se debe a la extinción de los radicales libres, que a su vez evitarán la reticulación acelerada de colágeno en la diabetes. Este estudio apoya el uso de curcumina para prevenir y tratar en algún grado la reticulación excesiva de proteínas en condiciones caracterizadas por la reticulación aceleradas tales como la diabetes.

Descripción de la invención

Los Solicitantes han postulado el mecanismo de “crosregulina” de los THC. Se ha descrito que este mecanismo es tanto cualitativamente como cuantitativamente diferente de la técnica anterior. En el trabajo experimental que conducía a la presente solicitud, el Solicitante ha evaluado los THC en el modelo *in vivo* de lesión cutánea por el agente químico, TPA, y el agente físico, rayos UVB. Además, los Solicitantes han probado los resultados prácticos de la modificación postraduccional de proteínas con la invención (es decir, su efecto sobre la enzima tirosinasa, la enzima que participa en la melanogénesis).

Efecto de la crosregulina sobre la inflamación inducida por TPA



WO 00/61162 describe el método de preparación de la mezcla de tetrahydrocurcuminoides de acuerdo con la presente invención y su uso para prevenir quemaduras solares.

El TPA induce muchos cambios bioquímicos y morfológicos en la piel del ratón, que parecen estar asociados con la inflamación y la promoción de tumores cutáneos. Por ejemplo, la aplicación tópica de TPA a la piel de ratones inducía rápidamente inflamación de la piel, actividad incrementada de ornitina descarboxilasa epidérmica, síntesis incrementada de DNA epidérmico, e incrementaba el número de capas celulares epidérmicas. La ornitina descarboxilasa (ODC), la primera enzima en la biosíntesis de poliamina, está altamente regulada por muchos estímulos tópicos, y los cambios en sus niveles y organización se correlacionan con cambios citoesqueléticos en queratinocitos humanos. Por lo tanto, los compuestos que inhiben TPA y afectan a la síntesis de ODC también afectarán a la organización del citoesqueleto y episodios relacionados de modificación postraduccional de proteínas y reticulación de proteínas en el citosol.

La técnica anterior muestra que los productos químicos que inhiben cambios bioquímicos y morfológicos inducidos por TPA habitualmente inhiben la promoción de tumores inducida por TPA en piel de ratón. Los Solicitantes han postulado que la composición de crosregulina de la invención es una composición óptima para proteger y conservar células vivas sanas y para evitar que los citoesqueletos de las células vivas sanas sean dañados por TPA y promotores de tumores similares a TPA. En un experimento efectuado *in vivo*, la piel de la oreja de ratones CF-1 hembra se trató bien con 20 microlitos de acetona, bien TPA en acetona o bien TPA con tetrahydrocurcuminoides de la invención [THC1], tetrahydrocurcuminoides conocidos [THC2] y tetrahydrocurcumina pura (sintética) conocida [THC3].

Cinco horas más tarde, los ratones fueron sacrificados y se pesaron perforaciones de la oreja (cuanto más alto es el registro del peso, más grave es la inflamación de la piel de la oreja tratada). Basándose en el registro del peso de las perforaciones de la oreja, se calculó el porcentaje de inhibición de la inflamación. La protección contra la inflamación en orden decreciente era suministrada por THC1 de la invención, seguido por THC2 de la técnica anterior, y finalmente seguido por THC3. El efecto protector dependía de la dosis en lo relativo a THC1 y THC2, mientras THC3 mostraba menos protección con una dosis de 0,36 mg en comparación con una dosis de 0,12 mg. La técnica anterior, según se ejemplifica por los datos de la investigación, no puede llevar a cabo la inhibición del edema de oreja inducido por TPA por encima de 80%. Es necesario más de 80% de inhibición de edema de oreja inducido por TPA para prevenir la reticulación de proteínas que podría potenciar el cáncer de piel. Por lo tanto, la acción de la crosregulina no es una parte inherente de cualquier composición de THC's, sino que es una composición específica la que proporciona la inhibición del mecanismo de TPA en más de 80%.

Otro mecanismo de la invención es para conservar la homeostasis y el funcionamiento de células basándose en su efecto regulador, tanto inhibidor como estimulante, de la reticulación de proteínas intracelulares. Este mecanismo regulador, previamente desconocido para la curcumina y sus derivados, tampoco está relacionado con las propiedades antioxidantes bien investigadas y descritas de la curcumina o los curcuminoides y la tetrahidrocurcumina o los tetrahidrocurcuminoides. Es un nuevo modo de alcanzar un amplio efecto regulador sobre los procesos biológicos. No se describió previamente un efecto regulador comparable sobre la reticulación de proteínas en el organismo con un solo compuesto o con productos combinados. En esencia, la invención difiere de otros compuestos que afectan al proceso de reticulación en que los compuestos previamente descritos estimularían o inhibirían la reticulación intracelular, mientras que la invención actuaría como un modificador de la reticulación (CLM, por sus siglas en inglés) o "crosregulina". Estos términos se usan en la presente memoria por primera vez para describir el mecanismo de la invención. CLM o crosregulina indica que una composición de la presente invención ejerce una influencia positiva sobre el proceso de modificación de proteínas postraduccionales y reticulación en estados tanto fisiológicos como patológicos, del mismo modo. El efecto del CLM de la invención se alcanza usando una composición específica del producto, según se describe en la sección "Procedimiento para Obtener THC". El mecanismo también se produce con modificaciones de la molécula de THC, por ejemplo éter-THC, trimetil-éter-THC, dimetil-éter-THC, bencil-éter-THC y sales de potasio, magnesio y cobre de THC. El mecanismo de la invención se ha demostrado en condiciones experimentales *in vivo*, tales como prevenir quemaduras solares por rayos UV y reticulación (porcentaje de células con dímero de timina) en las células cutáneas expuestas a radiación UV. Las propiedades biológicas de la invención se compararon con las de los curcuminoides, y a pesar del hecho de que la presente composición carece de color amarillo, sin embargo produce efectos protectores comparables a los de los curcuminoides amarillos contra la radiación UV. Esta actividad parece ser diferente de los efectos antioxidantes característicos del THC y los curcuminoides.

El TPA induce muchos cambios bioquímicos y morfológicos en la piel del ratón, que parecen estar asociados con la promoción de tumores de piel. Por ejemplo, la aplicación tópica de TPA a la piel de ratones inducía rápidamente inflamación de la piel, actividad incrementada de ornitina descarboxilasa epidérmica, síntesis incrementada de DNA epidérmico, e incrementaba el número de capas celulares epidérmicas. La ornitina descarboxilasa (ODC), la primera enzima en la biosíntesis de poliamina, está altamente regulada por muchos estímulos tróficos, y los cambios en sus niveles y organización se correlacionan con cambios citoesqueléticos en células humanas normales incluyendo queratinocitos epidérmicos [Pomidor MM, Cimildoro R, Lazatin B, Zheng P, Gurr JA, Leigh IM, Janne OA, Tuan RS, Hickok NJ Phosphorylated human keratinocyte ornithine decarboxylase is preferentially associated with insoluble cellular proteins. *Mol Biol Cell*, diciembre de 1999; 10(12):4299-310.]. Por lo tanto, los compuestos que inhiban TPA y afecten a la síntesis de ODC también afectarán a la organización del citoesqueleto y episodios relacionados de modificación postraduccionales de proteínas y reticulación de proteínas en el citosol.

La técnica anterior muestra que los productos químicos que inhiben los cambios bioquímicos y morfológicos inducidos por TPA habitualmente inhiben la promoción de tumores inducida por TPA en piel de ratón. Los presentes inventores han postulado que la composición de crosregulina de la invención es una composición óptima para proteger y conservar una célula viva sana y su citoesqueleto de ser dañados por TPA y promotores de tumores similares a TPA. En un experimento efectuado *in vivo*, la piel de la oreja de ratones CF-1 hembra se trató bien con 20 μ l de acetona, bien TPA en acetona o bien TPA con THcurcuminoides de la invención [THC1], THcurcuminoides de la técnica anterior [THC2] y THcurcumina pura [THC3] de la técnica anterior. Cinco horas más tarde, los ratones fueron sacrificados y se pesaron perforaciones de la oreja, cuanto más alto es el registro del peso, más grave es la inflamación de la piel de la oreja tratada. Basándose en el registro del peso de las perforaciones de la oreja, se calculó el porcentaje de inhibición de la inflamación. La mayor protección contra la inflamación era alcanzada por THC de la invención, seguido por THcurcuminoides de la técnica anterior, seguido por THcurcumina de la técnica anterior. El efecto protector dependía de la dosis con THcurcuminoides, mientras que la THcurcumina mostraba menos protección con una dosis de 0,36 mg que de 0,12 mg.

Definición de la acción de la crosregulina

Basándose en estos datos experimentales, la acción de la crosregulina se basa en un mecanismo antiinflamatorio y preventivo del cáncer que está limitado a cualquier compuesto que inhiba el proceso inflamatorio en al menos 80% en dos dosis probadas (es decir, 0,12 mg y 0,36 mg).

TABLA 1

Efectos de THC sobre el edema de oreja inducido por TPA

	Tratamiento	Nº de ratones	Peso/perforación	% de inhibición
5				
10	1. Acetona	2	6,3 ± 0,1	-
	2. TPA (1 nmol)	5	14,2 ± 0,6	-
15	3. TPA THC1 0,12	4	7,7 ± 0,2	82,3
	4. TPA THC1 0,36 mg	4	7,2 ± 0,2	88,6
	5. TPA THC2 0,12 mg	4	9,6 ± 0,5	58,2
20	6. TPA THC2 0,36 mg	4	8,3 ± 0,4	74,7
	7. TPA THC3 0,12 mg	4	7,8 ± 0,3	81,0
25	8. TPA THC3 0,36 mg	4	8,1 ± 0,3	77,2

30 Ratones CF-1 hembra se trataron tópicamente con 20 μ l de acetona, TPA (1 nmol) en acetona o TPA (1 nmol) y compuesto de prueba en acetona en ambas orejas. Cinco horas más tarde, los ratones fueron sacrificados y las perforaciones de las orejas se pesaron. Los datos se expresan como el EE medio.

THC1- invención, THC2 - técnica anterior, Mimura *et ál.*, patente de EE. UU. 5.266.344 expedida el 30 de nov. de 1993, THC3 - tetrahidrocurcumina pura (sintética).

35 Las transglutaminasas forman una familia de proteínas que han surgido para funciones especializadas tales como reticulación de proteínas o modificación postraducciona de proteínas. En tejidos sanos, la activación de las transglutaminasas y la reticulación de proteínas subsiguiente es parte de una respuesta celular protectora que contribuye a la homeostasis tisular (por ej., coagulación sanguínea, sustitución de células viejas para dar cabida a nuevas células corporales). La reticulación se ha sugerido como uno de los mecanismos implicados en el proceso del envejecimiento.

40 Entre las diversas reacciones de reticulación aleatorias o mediadas por enzimas, la actividad de reticulación inducida por transglutaminasas se ha propuesto por su posible implicación en la proliferación, la diferenciación y la muerte programada de las células.

45 En el caso de un estado de enfermedad, estas enzimas se han relacionado con un número de afecciones patológicas incluyendo fibrosis, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad celíaca y una enfermedad neoplásica. Por ejemplo, la activación de transglutaminasas en la enfermedad de Alzheimer puede ser responsable de reticulación de proteínas que conduce a la deposición de material amiloide en las células neurales. La modificación o reticulación postraducciona de proteínas puede representar un papel importante tanto en la mejora como en la inhibición de la iniciación, la promoción y la extensión del cáncer en el cuerpo. Las transglutaminasas exhiben una multifuncionalidad verdadera a nivel molecular. La actividad de reticulación puede ayudar a disparar fenómenos biológicos que dependen de la fase del desarrollo del tumor. Por ejemplo, las proteínas ras (oncogenes) pueden observarse como conmutadores moleculares que, cuando están reticulados, pueden iniciar tumores humanos. En ciertos tipos de lunares cutáneos, los oncogenes pueden sufrir conversión en melanoma cuando los rayos UVA potencien la reticulación de proteínas ras. En ese caso, la inhibición de la reticulación evitará la iniciación y el avance de la enfermedad maligna.

55

Por otra parte, la activación de transglutaminasas tisulares en una célula cancerosa metastática escasamente diferenciada puede dar lugar a una proteína reticulada que da como resultado apoptosis o muerte de células cancerosas. En este ejemplo, la reticulación de proteínas tendría un impacto positivo sobre el transcurso clínico de la enfermedad neoplásica. En caso de carcinomas de cuello del útero, los hallazgos indican que transglutaminasas específicas se regulan al alza en comparación con tejido de cuello del útero normal. Durante la carcinogénesis de cerebro de rata inducida por administración transplacentaria de N-etil-N-nitrosourea, la actividad de la transglutaminasa también se incrementaba en comparación con los animales de control.

60

65 La invención propone una solución práctica para regular las funciones de las transglutaminasas en ambos estados, salud y enfermedad, para el organismo humano o animal tratado ventajosamente. El mecanismo de la crosregulina es único para una composición de la invención. La técnica anterior, según se ejemplifica por los datos de la investigación,

no puede alcanzar la inhibición del edema de oreja inducido por TPA por encima del 80%. Es necesario más de 80% de inhibición del edema de oreja inducido por TPA para prevenir la reticulación de proteínas que podría potenciar el cáncer de piel. Por lo tanto, la acción de la crosregulina no es una parte inherente de ninguna composición de THC's, sino una composición específica que proporciona inhibición del mecanismo de TPA en más de 80%. La composición de la invención se ajusta a la definición de la acción de la crosregulina.

El experimento de inhibición de TPA muestra que incluso doblar la dosis de THC's de la técnica anterior no proporcionaría la inhibición por encima de 80%, mientras que los THC's de la invención pueden proporcionar la inhibición de más de 80% con cualquiera de las dosis experimentales. Además, el THC monocompuesto de la técnica anterior muestra menos inhibición de TPA con el incremento de la dosis experimental, a diferencia de la composición de la invención que proporciona un efecto inhibidor dependiente de la dosis.

La importancia de una eficacia biológica mínima de cualquier compuesto necesario para presentar un efecto biológico deseado no puede subestimarse. El mecanismo antiinflamatorio es diferente del mecanismo anticanceroso y ambos mecanismos pueden relacionarse con un nivel específico de potencia biológica.

Lo siguiente describe con detalle los mecanismos de esta invención:

1. Se propone que en los estados fisiológicos caracterizados por una modificación de proteínas postraduccional óptima, reticulación de proteínas, así como el potencial eléctrico óptimo de la célula, los THC no interferirían con los estados de bienestar celular ejemplificados anteriormente.
2. Sin embargo, en los estados caracterizados por una escasa diferenciación morfológica y funcional de las células, por ej. estados premalignos o enfermedad maligna, los THC contribuirían a la modificación postraduccional y la reticulación de proteínas y a la optimización del potencial eléctrico de la célula. Esto se alcanzaría mediante la interacción entre anillos fenólicos y enlaces olefinicos de THC y NH₂ así como grupos COO de los aminoácidos proteínicos. Los enlaces resultantes actuarían como un "ancla" que iniciaría la reticulación con otras proteínas.
3. En los estados de envejecimiento celular y en los estados en los que la reticulación aleatoria se precipita por una lesión térmica debida a la acción de los rayos UV, por ejemplo, el proceso no deseado se prevendría mediante la invención. Los THC evitarían la reticulación no deseada uniéndose a grupos amino y carboxi de los aminoácidos proteínicos. Esto daría como resultado una interferencia con la reticulación aleatoria, un mecanismo comparable a una acción "amortiguadora". Esta acción "amortiguadora" detendría eficazmente la reacción en cadena que de otro modo conduciría a un deterioro de la homeostasis celular, envejecimiento prematuro y muerte celular prematura.
4. La invención también tiene un mecanismo de apoyo para prevenir la reticulación aleatoria de proteínas intracelulares que se basa en las propiedades antioxidantes de los THC, específicamente en la capacidad de la invención para eliminar radicales libres. Se propone que debido a su acción antioxidante, facilitaría la ruptura de las cargas eléctricas de moléculas proteínicas "supercargadas", que es una de las razones por las que se acelera la reticulación aleatoria. Este mecanismo combinado de crosregulina y acción antioxidante es particularmente aplicable para prevenir afecciones inflamatorias tales como psoriasis.
5. La fuente de restos oxígeno en el THC para enlazarse a grupos NH₂ o COO procedería del grupo hidroxilo en para ya no en conjugación con el enlace olefínico, y de los grupos hidroxilo de los anillos fenólicos.
6. A diferencia del compuesto o los compuestos de curcumina o curcuminóide, la molécula o las moléculas de THC pueden girar más libremente, proporcionando así mejor acceso a los grupos reactivos para reacciones de "anclaje" y/o "amortiguación".
7. Considerando que, según se menciona previamente, la invención es relativamente inactiva en estados de fisiología celular, su mecanismo de crosregulina sería expresado gradualmente en proporción al grado de estrés que actúa sobre la célula. Así, el mecanismo de crosregulina del THC en el sistema biológico dependería de tipo de acción dañina experimentada por el sistema biológico.

Procedimiento para obtener THC

Los tetrahidrocurcuminoides de la invención son productos de la reducción química de los curcuminoides, obtenidos a partir de los rizomas de *Curcuma longa*, comúnmente conocida como cúrcuma, o cualquier otra planta adecuada procedente de la familia botánica Zingiberaceae.

La técnica anterior muestra que cuando curcuminoides obtenidos de *Curcuma longa* se reducen catalíticamente y a continuación se aíslan en el procedimiento de cristalización, se recupera tetrahidrocurcumina (THC) sin pérdida, pero con pérdidas sustanciales de tetrahidrobisdesmetoxicurcumina (THBDC) y tetrahidrodesmetoxicurcumina (THDC). Como resultado, la relación entre tetrahidrocurcuminoides se cambia significativamente en comparación con la relación original de los compuestos originarios, curcuminoides. Se prefiere la relación de curcuminoides, debido a que se correlaciona con la actividad biológica óptima de los curcuminoides. La Patente de EE. UU. N° 5.861.415 describe

ES 2 330 084 T3

curcuminoides en una relación específica y óptima como bioprotectores, que proporcionan un efecto protector máximo de la célula viva.

La presente invención proporciona un nuevo método más eficaz para recuperar THC's. Este procedimiento evita la pérdida de TBDMC y TDMC, y proporciona una composición bioprotectora de THC's.

THC	Curcuminoides	contenido de la técnica anterior en %	contenido de la invención en %
	Tetrahidrocurcuminoides	90	75 - 85
	Tetrahidrodesmetoxicurcumina	9	10 - 20
	Tetrahidrobisdesmetoxicurcumina	1	2 - 4.5

Breve esbozo del procedimiento de la técnica anterior para producir THC's

Curcuminoides naturales (95 %)	- 100 g
Acetona	- 1 litro
Pd-C (catalizador) 5%	- 2,5 g

La solución de curcuminoides naturales se cargó en un hidrogenador. El catalizador se añadió cuidadosamente y la presión de hidrógeno se mantuvo a aproximadamente 2 kg/cm². Esta reacción se completa en de 3 a 4 horas. A continuación, el catalizador se separa por filtración y se retira. La solución de acetona se concentra bajo vacío. El residuo se cristaliza en toluenos. Los tetrahidrocompuestos se separan por cristalización como un polvo blanco cremoso que tiene un punto de fusión de 92-94°C.

Procedimiento de la presente invención

Este procedimiento utiliza un nuevo método de saturación de dos enlaces olefínicos en curcuminoides en la reacción catalítica de transferencia de hidrógeno conocida como reacción de transferencia de hidruro. Lo siguiente es un ejemplo de un método de transferencia de hidruro.

1. Un matraz de fondo redondo de 3 litros con un agitador y un condensador de reflujo se carga con 1 litro de acetato de etilo;
2. La solución se carga con 250 g de curcuminoides naturales en una composición bioprotectora previamente descrita, es decir curcumina (C) 70-80%, desmetoxicurcumina (DMC) 15-20% y bisdesmetoxicurcumina (BDMC) 2,5-6,5%, y se agita hasta uniformidad a temperatura ambiente;
3. Esta mezcla se carga con 1 litro de trietilamina seguido por 12 g de paladio-carbono y 80 ml de ácido fórmico;
4. La mezcla se agita y subsiguientemente se somete a reflujo a 80 grados Celsius durante 12 horas;
5. Periódicamente, se cargó ácido fórmico en partes alícuotas de 5 ml a intervalos de 2 horas mientras se llevaba a cabo un reflujo;
6. Se comprobó la TLC para verificar la terminación de la reacción. (sistema: placas de 0,25 mm de grosor prerrevestidas con sílice/cloroformo:metanol = 9:1);
7. Después de la terminación de la reacción, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente. Se filtró para retirar el catalizador de paladio y se lavó con 50 ml de acetato de etilo;
8. El acetato de etilo y la trietilamina se separaron por destilación (se recogieron 2 litros de destilado);
9. La masa en bruto se extrajo a continuación con tolueno (3 x 500 ml);
10. El extracto de tolueno se lavó con 200 ml de HCl al 5% y 3 x 500 ml de agua y se secó sobre sulfato sódico;

11. El disolvente se retiró bajo vacío para dar una pasta de color amarillo claro de aproximadamente 200 g;
12. La pasta se suspendió con 200 ml de éter, se filtró y se secó bajo vacío para obtener un polvo amarillo claro de tetrahydrocurcuminoides, Rendimiento 175 g (70%).

Ensayo

THC de 75 a 85%
 THDHC de 10 a 20%
 THBDMC de 2 a 4,5%

En otra variación de la reacción de transferencia de hidruro, los curcuminoides se trataron con formiato amónico o dihidrogenofosfito sódico (como un reactivo catalítico de transferencia de hidrógeno) en presencia de Pd/C y ácido acético. La reducción se completa en de 20 a 30 minutos a de 100 a 110 grados Celsius. Este método da 50% de tetrahydrocurcuminoides.

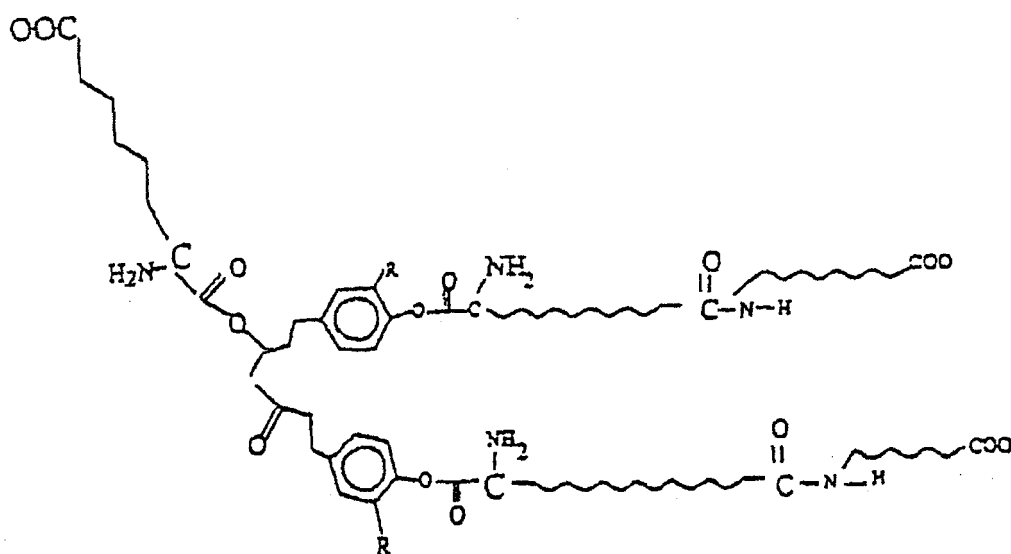
El THC puede administrarse tópicamente en un vehículo adecuado o con un dispositivo de aplicación, por ej. un parche transdérmico, en una concentración que varía de 0,025% a 5%; en la forma de inyecciones subcutáneas o un parche transdérmico en una concentración que varía de 0,025% a 5%; o en una forma de dosificación administrada oralmente en una concentración que varía de 5 mg a 500 mg por dosis o 0,083 - 8,3 mg/kg de peso corporal. El THC es adecuado para uso en seres humanos y animales.

Otras rutas de administración incluyen, pero no se limitan a: un aerosol u otro dispositivo para el aporte a los pulmones, una aspersión nasal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, vaginal y rectal. Excipientes que pueden usarse como un vehículo para el aporte del fago serán evidentes para los expertos en la técnica.

Las composiciones de tetrahydrocurcuminoides para administración tópica deben ser esencialmente incoloras. El término "esencialmente incoloras" pretende significar que la composición no contiene color o contiene una cantidad pequeña de color tal que la composición no manche la piel durante la administración tópica.

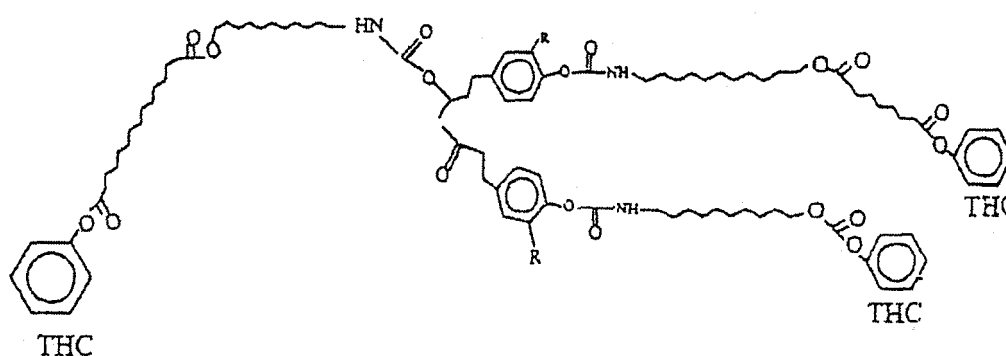
El término "curcumina con color eliminado" se refiere a la mezcla de tetrahydrocurcuminoides de acuerdo con la presente invención.

La molécula de THC actúa como un "ancla" para aminoácidos de proteínas, para iniciar reticulaciones de proteínas. Este mecanismo contribuiría a las reticulaciones fisiológicas.



Leyenda:  aminoácido/proteína

La molécula de THC actúa como un amortiguador para prevenir reticulaciones aleatorias en las reticulaciones precipitadas por radiación UV. Este mecanismo contribuiría a la prevención de reticulaciones patológicas.



Leyenda:  aminoácido/proteína

Referencias

1. **Majeed**, M. *et al.* (1995) Curcuminoids: Antioxidant Phytonutrients. *Nutriscience Publishers*, New Jersey.
2. **Shirota** *et al.* (1994) Tyrosinase inhibitors from crude drugs. *Biol Pharm Bull* 17(2):266-269
3. **Pan**, M.H. *et al.* (1999) Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab. Dispos.* 27(4):486-94.
4. **Osawa**, T. *et al.* (1995) Antioxidative activity of the tetrahydrocurcuminoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (9): 1609-12.
5. **Sugiyama**, Y. (1996) Involvement of the beta-diketone moiety in the antioxidative mechanism of Tetrahydro-curcumin. *Biochem Pharmacol*, 52(4):519-25, 23 de agosto
6. **Nakamura**, Y. *et al.* (1998) Inhibitory effects of curcumin and tetrahydrocurcuminoids on the tumor-promoter-induced reactive oxygen species generation in leukocytes, *in vitro* and *in vivo*.. *Jpn J Cancer Res*, 89(4):361-70
7. **Mukhopadhyaya**, A. *et al.* (1982). Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats, *Agents and Action*. 12, 2287.
8. **Rao**, T.S., *et al.* (1982) Antiinflammatory activity of curcumin analogues. *Ind J. Med. Res.*, 75 574-578
9. **Bont'e**, F. *et al.* (1997) Protective effects of curcuminoids on epidermal skin cells under free oxygen radical stress. *Planta Med.* 63(3):265-266.
10. **Mimura** *et al.*, patente de EE. UU. 5.266.344 expedida el 30 de nov. de 1993
11. **Sakuma** *et al.* (1999 Aug.). Relationship between tyrosinase inhibitory action and oxidation-reduction potential of cosmetic whitening ingredients and phenol derivatives. *Arch Pharm Res.* 1999. 22(4):335-339).
12. **Kollias** N, **Sayre** RM, **Zeise** L, **Chedekel** MR. Photoprotection by melanin. *J Photochem Photobiol B*, mayo de 1991; 9(2):135-160
13. **Morison** WL. Effects of ultraviolet radiation on the immune system in humans. *Photochem Photobiol*, octubre de 1989; 50(4):515-524.
14. **Li** W, **Hill** HZ. Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Photochem Photobiol*, marzo de 1997; 65(3):480-485.

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla que comprende:

75-85% de tetrahidrocurcumina;

10-20% tetrahidrodesmetoxicurcumina; y

2,0-4,5% de tetrahidrobisdesmetoxicurcumina,

para el uso en la prevención de afecciones inflamatorias, con la condición de que la afección inflamatoria no sea una quemadura solar por radiación UV.