

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 777**

51 Int. Cl.:

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A23L 33/105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2019** **PCT/US2019/023327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2019** **WO19183325**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2019** **E 19770717 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024** **EP 3768237**

54 Título: **Composiciones protectoras del hígado y aplicaciones terapéuticas**

30 Prioridad:

23.03.2018 US 201862647041 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2024

73 Titular/es:

SAMI-SABINSA GROUP LIMITED (100.0%)
19/1 & 19/2, I Main, II Phase Peenya Industrial
Area
Bangalore, Karnataka 560058, IN

72 Inventor/es:

MAJEED, MUHAMMED;
NAGABHUSHANAM, KALYANAM y
MUNDKUR, LAKSHMI

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

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

ES 2 983 777 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones protectoras del hígado y aplicaciones terapéuticas

5 Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

Se trata de una solicitud PCT en la que se reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. No. 62647041, presentada el 23 de marzo de 2018.

10 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con composiciones protectoras del hígado. Específicamente, la invención se relaciona con una composición que comprende curcuminoides y garcinol para la hepatoprotección. Más específicamente, la invención se relaciona con una mezcla que comprende una primera composición con 95 % en peso de curcuminoides y una segunda composición con 20 % en peso de garcinol para el tratamiento terapéutico de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) y condiciones asociadas.

Antecedentes de la invención

20 Las enfermedades del hígado graso no alcohólico (NAFLD) incluyen un espectro de enfermedades del hígado graso en ausencia de consumo de alcohol, que van desde el hígado graso hasta la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. Los diferentes grados o tipos de NAFLD incluyen a) esteatosis, b) esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), c) fibrosis, d) cirrosis, y e) carcinoma hepatocelular. La esteatosis se define como la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos o el exceso de grasa en el hígado. Se considera condición significativa de esteatosis un exceso mínimo de grasa de al menos 5-10 % de lo normal.

La segunda etapa de la NAFLD, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), es una condición potencialmente grave que conlleva un riesgo sustancial de progresión a fibrosis terminal, cirrosis y cáncer de hígado o carcinoma hepatocelular. Los atributos histopatológicos de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) incluyen esteatosis hepatocelular y abombamiento, inflamación mixta aguda y crónica y deposición de colágeno perivenular y perisinusoidal. La NASH se considera la manifestación hepática del trastorno metabólico y está estrechamente asociada a la diabetes de tipo 2, la obesidad, la resistencia a la insulina y el estado inflamatorio sistémico. Los siguientes documentos de técnicas anteriores divulgan los atributos característicos de la NAFLD y la NASH:

35 a) Williams, C.D., *et al.*, Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*, 2011; 140(1): 124-31.

40 b) Charlton, M.R., *et al.*, Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology*, 2011; 141(4):1249-53.

c) Sanyal, A., *et al.*, Population-based risk factors and resource utilization for HCC: US perspective. *Curr Med Res Opin*, 2010; 26(9):2183-91.

45 d) Ratziu, V., *et al.*, A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*, 2010; 53(2): 372-84.

50 e) Yki-Jarvinen, H., Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014; 2(11): 901-10.

La evaluación de la histopatología de la NASH y la NAFLD es importante para determinar el grado y la progresión de la enfermedad. Se ha desarrollado un sistema histológico de "clasificación y etapas" para reflejar los atributos únicos de la esteatohepatitis, las gradaciones de gravedad y fibrosis, y para promover la notificación uniforme de la histopatología (Brunt *et al.*, Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology; *Semin Liver Dis.* 2001;21(1):3-16), en donde un puntaje de estadificación refleja tanto la localización como la extensión de la enfermedad.

Otras NAFLD se pueden diferenciar de la NASH por el puntaje de actividad de la NAFLD (NAS, por sus siglas en inglés), la suma de los puntajes histopatológicos de una biopsia hepática para esteatosis (0-3 grados), inflamación lobular (0-2) y abombamiento hepatocelular (0-2). Un NAS menor a 3 corresponde a NAFLD, 3-4 corresponde a NASH limítrofe y mayor a 5 corresponde a NASH. En la biopsia también se puntúa la fibrosis (0-4). Del mismo modo, el sistema de clasificación de la inflamación globular y lobular, la inflamación portal y el grado de esteatosis está bien explicado y diferenciado por Kleiner *et al.*, Histology of NAFLD and NASH in adults and children, *Clin Liver Dis.* 2016; 20(2): 293-312.

65 La fibrosis ocurre al producirse más anomalías metabólicas y bioquímicas. Depende del desequilibrio entre el ritmo

de formación y depósito de colágeno. Los estadios de fibrosis incluyen la etapa 1, fibrosis perisinusoidal de zona 3; la etapa 2, fibrosis perisinusoidal con fibrosis portal; la etapa 3, como la anterior con fibrosis en puente; y la etapa 4 descrita por Brunt *et al.*, Non alcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94(9):2467-74. La fibrosis se puede diagnosticar en enfermedades hepáticas usando la hidroxiprolina y el estrés oxidativo como biomarcadores (Gabr *et al.*, Prediction of fibrosis in hepatitis C. patients: assessments using hydroxyproline and oxidative stress biomarkers. *Indian Virological Society* 2013; 25(1): 91-100).

Los marcadores de estrés oxidativo también desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la salud del hígado. La importancia del marcador de estrés oxidativo como parámetro no invasivo para la valoración de la fibrosis hepática (Novitskiy G *et al.*, Effects of ethanol and acetaldehyde on reactive oxygen species production in rat hepatic stellate cells, *Alcohol Clin Exp Res.* 2006;30(8): 1429-35). Está documentado que los marcadores de estrés oxidativo, las enzimas antioxidantes y la hidroxiprolina desempeñan un papel en la patogénesis del CHC (por sus siglas en inglés). Clichici S *et al.*, Non-invasive oxidative stress markers for liver fibrosis development in the evolution of toxic hepatitis. *Acta Physiol Hung.* 2011;98 (2):195-204).

La NASH es usualmente una enfermedad silenciosa con síntomas mínimos, mientras que la pérdida de peso, la fatiga y la debilidad se desarrollan a medida que la enfermedad progresa. Se determina que los individuos con hígado graso de NAFLD tienen las enzimas hepáticas elevadas y la reducción de la población de enzimas hepáticas corregirá o mejorará la condición del hígado. La técnica más avanzada para controlar el recuento de enzimas consiste en proporcionar glutamina, un aminoácido natural que se usa como suplemento nutricional.

Existe una necesidad urgente de tratamiento terapéutico de los NAFLD. Es una carga importante para el sistema sanitario público, sin fármacos aprobados para su tratamiento. El principal modo de tratamiento es la gestión del estilo de vida, mientras que la pioglitazona y la vitamina E se han usado como farmacoterapia para reducir la lesión hepatocelular, la fibrosis y mejorar la esteatohepatitis. Otros métodos son usar sensibilizadores a la insulina o biguanidas, por ejemplo, metformina.

Actualmente también se usan moléculas naturales de distintas fuentes vegetales para la hepatoprotección y el tratamiento de las NAFLD (Madrigal-Santillán *et al.*, Review of natural products with hepatoprotective effects, *World J Gastroenterol.* 2014; 20(40): 14787-14804). La curcumina de *Curcuma sp.* es bien conocida por su efectividad terapéutica para mitigar los síntomas de la NASH (Rahmani *et al.*, Treatment of Non-alcoholic Fatty Liver Disease with Curcumin: A Randomized Placebo-controlled Trial, *Phytotherapy Research*, 2016; 30(9): 1540-1548; Amato *et al.*, NAFLD and Atherosclerosis Are Prevented by a Natural Dietary Supplement Containing Curcumin, Silymarin, Guggul, Chlorogenic Acid and Inulin in Mice Fed a High-Fat Diet, *Nutrients* 2017, 9(5), 492; <https://doi.org/10.3390/nu9050492>). El garcinol de *Garcinia sp.* es también un conocido agente hepatoprotector (WO2012092430A1). Sin embargo, la mayoría de las moléculas naturales no confieren una protección completa contra todos los síntomas de las NAFLD. Sigue existiendo una necesidad industrial insatisfecha de una composición que sea segura y fiable y que provoque una capacidad hepatoprotectora mitigando la mayoría de los síntomas asociados con la NAFLD y la NASH.

La presente invención proporciona una composición sinérgica que comprende curcuminoides y garcinol para el manejo terapéutico de NAFLD y condiciones asociadas como NASH, fibrosis y cirrosis.

Es el objeto principal de la invención divulgar una mezcla hepatoprotectora sinérgica que comprende una primera composición que comprende 95 % p/p curcuminoides y una segunda composición que comprende 20 % p/p garcinol para usar en el manejo terapéutico de NAFLD y condiciones asociadas a la misma.

La presente invención resuelve los objetivos mencionados y proporciona otras ventajas relacionadas.

Breve descripción de la invención

El alcance de esta invención se define en las reivindicaciones. Las realizaciones de la descripción relativas a métodos de tratamiento no están cubiertas por las reivindicaciones. Cualquier "realización" o "ejemplo" que se divulgue en la descripción pero que no esté contemplado en las reivindicaciones se debe considerar presentado únicamente a título ilustrativo.

Los porcentajes descritos en la presente se deben considerar como % p/p. Lo divulgado en la presente es una mezcla que comprende una primera composición con 95 % p/p de curcuminoides y una segunda composición con 20 % p/p de garcinol para usar como agente hepatoprotector. Más específicamente, la invención divulga el uso de una mezcla que comprende una primera composición con 95 % en peso de curcuminoides y una segunda composición con 20 % en peso de garcinol para su uso en el tratamiento terapéutico de los NAFLD y condiciones asociadas como esteatosis, NASH, fibrosis hepática y cirrosis.

Otros atributos y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción más detallada, tomada conjuntamente con las imágenes adjuntas, que ilustran, a modo de ejemplo, el principio de

la invención.

Breve descripción de las figuras

5 El expediente de patente o de solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. La oficina facilitará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) en color previa solicitud y pago de la tasa correspondiente.

La Figura 1 muestra las secciones histopatológicas de hígado teñidas con hematoxilina y eosina.

La Figura 2 es una representación gráfica que muestra el puntaje de NAFLD en secciones de hígado de animales administrados con garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides. El puntaje de NAFLD se calcula basado en las secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina.

La Figura 3 es una representación gráfica que muestra el puntaje de esteatosis en secciones de hígado de animales administrados con garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides.

La Figura 4 es una representación gráfica que muestra el puntaje de abombamiento en secciones de hígado de animales administrados con garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides.

La Figura 5 es una representación gráfica que muestra el área de fibrosis en secciones de hígado de animales administrados con garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides.

La Figura 6 es una representación gráfica que muestra los niveles de hidroxiprolina hepática en animales administrados con garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides.

La Figura 7 muestra las micrografías histopatológicas de las secciones hepáticas teñidas con rojo de Picrosirius que muestran la deposición de colágeno en los animales administrados con garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides.

La Figura 8 es la representación gráfica de los niveles de adiponectina en animales administrados con garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides.

La Figura 9 es la representación gráfica que muestra los niveles plasmáticos de TNF α (por sus siglas en inglés) en animales administrados con garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides.

La Figura 10 es la representación gráfica de los niveles plasmáticos de glutatión en animales administrados con garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides.

La Figura 11 es una representación gráfica de los niveles plasmáticos de glutatión peroxidasa en animales a los que se administró garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides.

La Figura 12 es una representación gráfica del grado de peroxidación lipídica en animales a los que se administró garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides.

La Figura 13 es la representación gráfica que muestra la expresión de TNF α , NPKB y MCP1 (por sus siglas en inglés, respectivamente) en animales administrados con garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides.

La Figura 14 es la representación gráfica que muestra la expresión de TGF β (por sus siglas en inglés) y colágeno 1 en animales administrados con garcinol, curcuminoides y garcinol + curcuminoides.

Descripción de las realizaciones más preferidas

La presente invención divulga una mezcla que comprende una primera composición con 95 % de curcuminoides y una segunda composición con 20 % de garcinol para usar en el tratamiento terapéutico de la NAFLD y las condiciones asociadas en mamíferos. En una realización relacionada, las condiciones asociadas de NAFLD incluyen NAFL, NASH, fibrosis y cirrosis. En una realización relacionada, los síntomas de la NAFL incluyen una acumulación anormal de grasa en los hepatocitos. En la realización relacionada, los síntomas NASH incluyen, pero no se limitan a, infiltración inflamatoria y abombamiento hepatocelular.

En otra realización relacionada, los síntomas de la fibrosis incluyen niveles elevados de hidroxiprolina y deposición patológica de colágeno en el hígado. En otra realización relacionada, los síntomas de la NAFLD y las condiciones asociadas incluyen el aumento de la expresión de marcadores inflamatorios, niveles elevados de enzimas hepáticas, aumento de la peroxidación lipídica, disminución de los niveles de antioxidantes, aumento de la expresión de colágeno y reducción de los niveles de adiponectina. En otra realización relacionada, los marcadores inflamatorios se seleccionan del grupo que comprende TNF α , NPKB, TGF β y MCP1.

En otro aspecto, la enzima hepática es preferiblemente ALT (por sus siglas en inglés). En otro aspecto relacionado, los antioxidantes se seleccionan del grupo que comprende el glutatión y la glutatión peroxidasa. En una realización relacionada, 95 % de curcuminoides y 20 % de garcinol en las dos composiciones se administran en concentraciones de aproximadamente 10-50 mg/kg de peso corporal y 1-10 mg/kg de peso corporal, respectivamente. En otra realización relacionada, 95 % de curcuminoides está presente en una relación de aproximadamente 75-81 % de curcumina, 15-19 % de demetoxicurcumina, y 2,2-6,5 % de bisdemetoxicurcumina. En otro aspecto relacionado, 20 % de garcinol se obtiene de *Garcinia sp.* En una realización preferida, *Garcinia sp.* es *Garcinia indica*. En otro aspecto relacionado, el mamífero es humano.

En otro aspecto, la composición se formula con excipientes y adyuvantes farmacéuticamente/nutracéuticamente aceptados y se administra por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, jarabes, gominolas, polvos, suspensiones, emulsiones, masticables, caramelos o comestibles. En otro aspecto relacionado, la composición que comprende 95 % de curcuminoides y 20 % de garcinol se puede formular con otros ingredientes conocidos para la protección del hígado.

En otra realización preferida, la invención divulga una mezcla que comprende una primera composición que comprende 95 % de curcuminoides y una segunda composición que comprende 20 % de garcinol para usar en el manejo terapéutico de síntomas asociados con NAFL en mamíferos. En una realización relacionada, los síntomas de la NAFL incluyen una acumulación anormal de grasa en los hepatocitos.

En una realización relacionada, 95 % de curcuminoides y 20 % de garcinol en las dos composiciones se administran en concentraciones de aproximadamente 10-50 mg/kg de peso corporal y 1-10 mg/kg de peso corporal, respectivamente.

En otra realización relacionada, 95 % de curcuminoides están presentes en una relación de aproximadamente 75-81 % de curcumina, 15-19 % de demetoxicurcumina, y 2,2-6,5 % de bisdemetoxicurcumina. En otra realización relacionada, el mamífero es humano. En una realización preferida, la invención divulga una mezcla que comprende una primera composición que comprende 95 % de curcuminoides y una segunda composición que comprende 20 % de garcinol para usar en el manejo terapéutico de síntomas asociados con NASH en mamíferos.

En una realización relacionada, los síntomas de NASH incluyen, pero no se limitan a, infiltración inflamatoria, enzimas hepáticas elevadas y abombamiento hepatocelular. En otra realización relacionada, los marcadores inflamatorios se seleccionan del grupo que consiste en, pero no se limitan a, interleucinas, TNF α ; y TGF β . En otra realización relacionada, las enzimas hepáticas se seleccionan del grupo que consiste en transaminasas, aminotransferasas y fosfatasas. En una realización relacionada, la enzima hepática es preferiblemente ALT.

En una realización relacionada, 95 % de curcuminoides y 20 % de garcinol en las dos composiciones se administran en concentraciones de aproximadamente 10-50 mg/kg de peso corporal y 1-10 mg/kg de peso corporal, respectivamente. En otra realización relacionada, 95 % de curcuminoides están presentes en una relación de aproximadamente 75-81 % de curcumina, 15-19 % de demetoxicurcumina, y 2,2-6,5 % de bisdemetoxicurcumina. En otra realización relacionada, el mamífero es humano.

En otra realización preferida, la invención divulga una mezcla que comprende una primera composición que comprende 95 % de curcuminoides y una segunda composición que comprende 20 % de garcinol para usar en la reducción de síntomas y marcadores asociados con la fibrosis hepática en mamíferos. En una realización relacionada, los marcadores de fibrosis hepática incluyen, pero no se limitan a, citocinas inflamatorias, enzimas hepáticas elevadas e hidroxiprolina, y deposición patológica de colágeno en el hígado. En otra realización relacionada, los marcadores inflamatorios se seleccionan del grupo que consiste en, pero no se limitan a, interleucinas, TNF α y TGF β . En otra realización relacionada, las enzimas hepáticas se seleccionan del grupo que consiste en transaminasas, aminotransferasas y fosfatasas.

En una realización relacionada, 95 % de curcuminoides y 20 % de garcinol en las dos composiciones se administran en concentraciones de aproximadamente 10-50 mg/kg de peso corporal y 1-10 mg/kg de peso corporal, respectivamente. En otra realización relacionada, 95 % de curcuminoides están presentes en una relación de aproximadamente 75-81 % de curcumina, 15-19 % de metoxicurcumina, y 2,2-6,5 % de bismetoxicurcumina. En otra realización relacionada, el mamífero es humano.

En otra realización preferida, la invención divulga una mezcla que comprende una primera composición que comprende 95 % de curcuminoides y una segunda composición que comprende 20 % de garcinol para usar como agente hepatoprotector. En una realización relacionada, 95 % de curcuminoides y 20 % de garcinol en las dos composiciones se administran en concentraciones de aproximadamente 10-50 mg/kg de peso corporal y 1-10 mg/kg de peso corporal, respectivamente. En otra realización relacionada, 95 % de curcuminoides están presentes en una relación de aproximadamente 75-81 % de curcumina, 15-19 % de demetoxicurcumina, y 2,2-6,5 % de bisdemetoxicurcumina. En otra realización relacionada, el mamífero es humano.

Los siguientes ejemplos ilustrativos se incluyen para comprender los atributos técnicos y las ventajas de la presente invención.

Ejemplos

En los ejemplos siguientes, el uso combinado de curcuminoides y garcinol es conforme a la invención reivindicada. Usar solamente un vehículo, solamente garcinol o solamente curcuminoides se debe considerar un ejemplo de referencia. Los porcentajes se deben considerar como % p/p.

Ejemplo 1: Métodos

Modelo de ratón

Los experimentos se llevan a cabo en el modelo STAM (por sus siglas en inglés) de NASH-HCC (por sus siglas en inglés). El modelo STAM de NASH se usa mucho principalmente porque recapitula todo el espectro de la NAFLD humana, desde la esteatosis hasta la NASH y la fibrosis hepática. Además, los fenotipos histológicos observados en este modelo son como los observados en muestras clínicas humanas, lo que permite usar el mismo sistema de puntuación (puntaje de actividad de NAFLD; NAS) para valorar la gravedad de la enfermedad (Kazuki Talcakura *et al.*, Mouse models for investigating the underlying mechanisms of non alcoholic steatohepatitis-derived hepatocellular carcinoma; *World J Gastroenterol*; 2018 May 14; 24 (18); 1989-1994).

En el modelo de ratones STAM no hay aumento de peso y los animales no muestran obesidad a pesar de alimentarse con una dieta rica en grasas.

Protocolo

Se obtuvieron ratones C57BL/6 preñados de 14 días libres de patógenos de Japan SLC, Inc. (Japón), se estableció la NASH en ratones macho por una única inyección subcutánea de 200 µg de estreptozotocina (Sigma, EE.UU.) después del nacimiento y se alimentaron con una dieta rica en grasas (CLEA Japan, Japón) *ad libitum* después de 4 semanas de edad (edad 28 ± 2 días). Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos de 8 ratones cada uno a las 5 semanas de edad (edad 35 ± 2 días) el día anterior al inicio del tratamiento.

Grupos

Grupo 1 (Vehículo): A ocho ratones con NASH se les administró por vía oral vehículo [0,5 % metilcelulosa] en un volumen de 5 mL/kg una vez al día de 5 a 9 semanas de edad,
Grupo 2 (20 % de garcinol): A ocho ratones con NASH se les administró por vía oral vehículo suplementado con 20 % de garcinol a una dosis de 10 mg/kg una vez al día desde las 5 hasta las 9 semanas de edad,
Grupo 3 (95 % de curcuminoides - comercialmente disponible como Curcumin C3 complex® de Sabinsa Corporation, EE.UU.): A ocho ratones con NASH se les administró por vía oral vehículo suplementado con Curcumin C3 complex® a una dosis de 50 mg/kg una vez al día de 5 a 9 semanas de edad,
Grupo 4 (20 % de garcinol y Curcumin C3 complex®): A ocho ratones con NASH se les administró por vía oral vehículo suplementado con garcinol al 20 % a una dosis de 10 mg/kg y Curcumin C3 complex® a una dosis de 50 mg/kg una vez al día de las 6 a las 9 semanas de edad.

La Tabla 1 resume el programa de tratamiento.

Tabla 1: Programa de tratamiento

Grupo	No. Ratones	Ratones	Sustancia de prueba	Dosis (mg/kg)	Volumen (mL/kg)	Régimen	Sacrificio (semanas)
1	8	STAM	Vehículo	-	5	PO, QD 5-9 Semanas	9
2	8	STAM	20 % de garcinol	10	5	PO, QD 5-9 Semanas	9
3	8	STAM	95 % de curcuminoides	50	5	PO, QD 5-9 Semanas	9
4	8	STAM	20 % de garcinol	10	5	PO, QD 6-9 Semanas	9
			95 % de curcuminoides	50			

Todos los animales fueron sacrificados sin crueldad a las 9 semanas de edad y se registraron el peso de los órganos, el peso individual del hígado y la relación entre el peso del hígado y el peso corporal.

Recolección de muestras

Para las muestras de plasma, se recolectó sangre en ayunas en tubos de polipropileno con anticoagulante (Novo-Heparina) y se centrifugó a 1.000 xg por 15 minutos a 4 °C. Se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -80 °C.

Para las muestras de hígado congeladas, el lóbulo medial izquierdo y el lóbulo caudado se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Para los bloques de hígado incluidos en parafina, se recolectó el lóbulo lateral izquierdo y se cortó en 6 piezas. Dos piezas del lóbulo lateral izquierdo se fijaron en solución de Bouin y posteriormente se incrustaron en parafina.

Para las muestras de ADNc, los otros 2 trozos del lóbulo lateral izquierdo se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. El ARN total se extrajo de muestras de hígado usando RNAiso (Takara Bio, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó una mezcla de reacción que contenía 4,4 mM de MgCl₂ (F. Hoffmann-La Roche, Suiza), 40 U de inhibidor de la ARNasa (Toyobo, Japón), 0,5 mM de dNTP (por sus siglas en inglés, Promega, EE.UU.), 6,28 µM de hexámero aleatorio (Promega), 5x amortiguador de primera hebra (Promega), 10 mM de ditiotritol (Invitrogen, EE.UU.) y 200 U de MMLV-RT (por sus siglas en inglés, Invitrogen) en un volumen final de 20 µL. La reacción se llevó a cabo por 1 hora a 37 °C, seguida de 5 minutos a 99 °C.

Medición de la bioquímica de la sangre total y del plasma

La glucemia en ayunas se midió en sangre total usando un medidor de glucosa Stat Strip (NIPRO CORPORATION, Japón). Para la bioquímica plasmática, se recolectó sangre sin ayuno en tubos de polipropileno con anticoagulante (Novo-Heparin, Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Japón) y se centrifugó a 1.000 xg por 15 minutos a 4 °C. Se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -80 °C hasta su uso. La ALT plasmática y el colesterol total se midieron con FUJI DRI-CHEM 7000 (Fujifilm, Japón). La estimación de la adiponectina se realizó según el manual del usuario de R&D Systems.

Medición de la bioquímica hepática

Medición del contenido de triglicéridos en el hígado

Los extractos lipídicos totales del hígado se obtuvieron por el método de Folch (Folch J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1957; 226: 497). Las muestras de hígado se homogeneizaron en cloroformo-metanol (2:1, v/v) y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar con cloroformo-metanol-agua (8:4:3, v/v/v), los extractos se evaporaron hasta sequedad y se disolvieron en isopropanol. El contenido hepático de triglicéridos se midió por la prueba E de triglicéridos (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japón).

Medición del contenido de hidroxiprolina en el hígado

Para cuantificar el contenido de hidroxiprolina hepática, las muestras de hígado congeladas se procesaron por un método de hidrólisis alcalina-ácida como se indica a continuación. Las muestras de hígado se desengrasaron con acetona al 100 %, se secaron al aire, se disolvieron en NaOH 2 N a 65 °C y se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 20 minutos. Las muestras lisadas (400 µL) se hidrolizaron con 400 µL de HCl 6 N a 121 °C por 20 minutos, y se neutralizaron con 400 µL de NaOH 4 N que contenía 10 mg/mL de carbón activado. Se añadió amortiguador AC (ácido acético 2,2 M/ácido cítrico 0,48 M, 400 µL) a las muestras, seguido de centrifugación para recolectar el sobrenadante. Se construyó una curva patrón de hidroxiprolina con diluciones seriadas de *trans*-4-hidroxi-L-prolina (Sigma-Aldrich) a partir de 16 µg/mL. Las muestras y los patrones preparados (cada uno de 400 µL) se mezclaron con 400 µL de solución de cloramina T (Wako Pure Chemical Industries) y se incubaron por 25 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras se mezclaron posteriormente con solución de Ehrlich (400 pL) y se calentaron a 65 °C por 20 minutos para desarrollar el color. Después de enfriar las muestras en hielo y centrifugarlas para eliminar los precipitados, se midió la densidad óptica de cada sobrenadante a 560 nm. Las concentraciones de hidroxiprolina se calcularon a partir de la curva patrón de hidroxiprolina. Las concentraciones de proteínas de las muestras de hígado se determinaron usando un kit de ensayo de proteínas BCA (por sus siglas en inglés, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y se usaron para normalizar los valores calculados de hidroxiprolina. Los niveles de hidroxiprolina hepática se expresaron en µg por mg de proteína.

Los niveles de TNFα se estimaron por ELISA (por sus siglas en inglés) de citocinas de acuerdo con la descripción del fabricante (R&D Systems).

Los antioxidantes glutatión, glutatión peroxidasa y peroxidación lipídica se estimaron usando procedimientos estándar descritos por:

Ellman, CiL 1959, "Tissue sulfhydryl groups", *Archives Biochemistry Biophysics*, vol. 82, pp.70-77.

Paglia, DE & Valentine, WN 1967, "Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase", *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol.70, pp.158-169.

Buege, JA & Aust, SD 1978, "Microsomal lipid peroxidation", *Methods Enzymol*, vol. 52, pp.302-310.

5 Análisis histológicos

Para la tinción con HE (por sus siglas en inglés), se cortaron secciones de bloques de parafina de tejido hepático prefijados en solución de Bouin y teñidos con hematoxilina de Lillie-Mayer (Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Japón) y solución de eosina (Wako Pure Chemical Industries). El puntaje de actividad de NAFLD (NAS) se calculó de acuerdo con los criterios de Kleiner (Kleiner DE. *et al.*, *Hepatology*, 2005; 41:1313).

Para visualizar la deposición de colágeno, se tiñeron secciones de hígado fijadas de Bouin usando solución de rojo de Picrosirius (Waldeck, Alemania). Para el análisis cuantitativo del área de fibrosis, se capturaron imágenes de campo claro de secciones teñidas con rojo de Sirius alrededor de la vena central usando una cámara digital (DFC295; Leica, Alemania) con un aumento de 200 veces, y se midieron las áreas positivas en 5 campos, sección usando el software ImageJ (National Institute of Health, EE.UU.) SR_SLMN039-1704-08116.

20 Pruebas estadísticas

Los análisis estadísticos se realizaron usando la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni en GraphPad Prism 6 (Graph Pad Software Inc., EE.UU.). Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se asumió la existencia de una tendencia cuando una prueba-t de una cola arrojó valores de $P < 0,1$. Los resultados se expresaron como media $\pm$ DE.

25 Resultados

El hígado graso no alcohólico (NAFLD) se caracteriza por esteatosis hepática en ausencia de antecedentes de consumo significativo de alcohol u otra enfermedad hepática conocida. La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es la forma progresiva de la NAFLD. El comité de patología de la NASH Clinical Research diseñó y validó un sistema de puntaje de atributos histológicos que aborda el espectro completo de lesiones de NAFLD y propuso un puntaje de actividad de NAFLD para usar en ensayos clínicos. El puntaje de NAFLD se calcula basado en las secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina (Figura 1). El tratamiento con garcinol + curcuminoides mostró una disminución significativa de la enfermedad de hígado graso con un menor puntaje de NAFLD (Figura 2). Además, el tratamiento con garcinol + curcumina también mostró una disminución significativa de la esteatosis (Figura 3) y el abombamiento de los hepatocitos (Figura 4).

Los resultados indicaron que el tratamiento con una mezcla de 20 % de garcinol y 95 % de curcuminoides mostró una disminución significativa en el puntaje de actividad NAFLD en comparación con el control no tratado y 20 % de garcinol y 95 % de curcuminoides individuales, indicando así una disminución sinérgica de la enfermedad del hígado graso y proporcionando sinergia entre la combinación que comprende 20 % de garcinol y 95 % de curcuminoides cuando se administra individualmente mostró menor puntaje NAFLD en comparación con el control no tratado, pero mayor que la combinación. En la esteatosis, el abombamiento de los hepatocitos es un atributo que denota lesión celular y se caracteriza por hepatocitos agrandados e hinchados. Con respecto al tratamiento de la NASH, el tratamiento con una mezcla de 20 % de garcinol y 95 % de curcuminoides mostró una disminución sinérgica significativa de la esteatosis y el abombamiento de los hepatocitos.

La fibrosis hepática depende del desequilibrio entre la tasa de formación y depósito de colágeno, que se asocia a numerosas anomalías metabólicas y bioquímicas. La fibrosis hepática es un estado reactivo, benigno o patológico de formación de tejido conjuntivo fibroso en exceso, que constituye una actividad reparadora para proteger la integridad del hígado durante condiciones patológicas. Su nivel en los tejidos hepáticos decide el ritmo y la progresión de la fibrogénesis hepática. Su actividad de detección fibrótica no invasiva sirve como biomarcador en enfermedades hepáticas crónicas con fibrosis grave. El área de fibrosis se midió por tinción con rojo de Sirius de cuantificación morfométrica de secciones de hígado. Se observó que 20 % de garcinol y 95 % de curcuminoides reducían sinérgicamente el área de fibrosis, lo que indicaba un menor depósito de colágeno (Figura 5).

La hidroxiprolina es uno de los principales componentes del colágeno fibrilar y representa aproximadamente 14 % del contenido total de aminoácidos. El desarrollo de la fibrosis depende principalmente de la incorporación de hidroxiprolina al procolágeno. Además, la hidroxiprolina es el único aminoácido que restringe la síntesis de las fibrillas de colágeno en los tejidos conjuntivos. Durante la degradación del colágeno, el contenido de hidroxiprolina liberado en el hígado, la orina y el suero se correlaciona con la fibrosis y se puede usar como marcador diagnóstico para los puntajes fibróticos (Need AG. Bone resorption markers in vitamin 17 insufficiency; *Clin Chim Acta*. 2006; 368:48-52.) El tratamiento con la composición de garcinol-curcuminoides redujo sinérgicamente los niveles de hidroxiprolina (Figura 6) reduciendo así la deposición de colágeno como se representa en la Figura 7 cuando se tiñó con rojo de Picrosirius. No se observaron cambios en el peso corporal ni en el peso del hígado (Tabla 2) en todos los grupos de tratamiento en comparación con el control.

Tabla 2: Peso corporal y peso del hígado

Parámetro	Vehículo	Garcinol	Curcuminoides	Garcinol y curcuminoides
Peso corporal (g)	20,2 ± 1,3	20,3 ± 1,5	20,9 ± 1,7	20,0 ± 2,8
Peso del hígado (mg)	1480 ± 140	1467 ± 120	1584 ± 117	1415 ± 183
Relación hígado/peso corporal (%)	7,4 ± 0,7	7,3 ± 0,8	7,6 ± 0,9	7,1 ± 0,4

- 5 En cuanto a los parámetros bioquímicos, no hubo cambios en los niveles de glucosa plasmática, colesterol total y triglicéridos (Tabla 3) en los grupos de tratamiento en comparación con el control. Sin embargo, los niveles plasmáticos de ALT, que estaban elevados debido a la NAFLD, se redujeron significativamente con la composición que contenía garcinol y curcuminoides (Tabla 3), lo que indica el efecto hepatoprotector de la composición.

10 Tabla 3: Parámetros bioquímicos séricos

Parámetro	Vehículo	Garcinol	Curcuminoides	Garcinol y curcuminoides
Glucosa en sangre total (mg/dL)	533 ± 75	564 ± 51	560 ± 43	605 ± 73
ALT plasmática (U/L)	51 ± 12	56 ± 12	56 ± 16	47 ± 14
Colesterol total plasmático (mg/dL)	15,2 ± 25	151 ± 18	162 ± 32	172 ± 50
Triglicéridos hepáticos (mg/g hígado)	57,5 ± 28,9	71,8 ± 33,3	93,0 ± 27,3	76,9 ± 29,8

- 15 La adiponectina controla el metabolismo tanto de la glucosa como de los lípidos, disminuyendo la gluconeogénesis y aumentando la glucólisis y la oxidación de los ácidos grasos. Los niveles de adiponectina se redujeron significativamente en el modelo de ratón NAFLD. La composición que comprende garcinol y curcuminoides aumenta efectivamente los niveles de adiponectina (Figura 8) confiriendo hepatoprotección.

- 20 Los niveles plasmáticos del marcador inflamatorio TNF α eran elevados en la NAFLD. La composición de curcuminoides y garcinol + curcuminoides reduce significativamente los niveles de TNF α (Figura 9). La composición también aumentó los niveles de los antioxidantes glutatión (Figura 10) y glutatión peroxidasa (Figura 11) y redujo significativamente la peroxidación lipídica (Figura 12), lo que indica su papel como agente antioxidante y antiinflamatorio.

25 Ejemplo 2: Estudios de expresión génica

Se evaluó la expresión de los marcadores inflamatorios TNF α , NPkB, TGF β y MCP1.

β -Actina

F-GAAGTCCCTCACCCCTCCCAA

R-GGCATGGACGCGACCA

NPkB

F-GAAATTCCTGATCCAGACAAAAC

R-ATCACTTCAATGGCCTCTGTGTAG

TNF α

F-CTCCAGGCGGTGCCTATGT

R-GAAGAGCGTGGTGGCCC

MCP1

F-GCATCCACGTGTTGGCTCA

R-CTCCAGCCTACTCATTGGGATCA

TGF β

F-TTGCCCTCTACAACCAACACAA

R-GGCTTGCGACCCACGTAGTA

Colágeno 1

F-TTCCCTGGACCTAAGGGTACT

R-TTGAGCTCCAGCTTCGCC

Las expresiones de marcadores inflamatorios principalmente TNF α , NPkB y MCP1 (Figura 13) se reducen en el

hígado de los animales tratados con la composición de la invención. 95 % de curcuminoides junto con 20 % de garcinol mostraron una mayor inhibición del TNF α , NF κ B y MCP1. La expresión de TGF β y colágeno 1, que son marcadores clave de fibrosis, también se redujo significativamente con la composición (Figura 14).

5 En general, la mezcla que comprende una primera composición que contiene 95 % en peso de curcuminoides y una segunda composición que contiene 20 % en peso de garcinol actúa de forma sinérgica, lo que produce una reducción significativa de la NAFLD, una disminución significativa de la hidroxiprolina hepática, una disminución significativa de la esteatosis, una tendencia decreciente de la fibrosis y la NASH, una reducción del abombamiento de los hepatocitos y una menor deposición patológica de colágeno en el hígado, confiriendo así protección al

10 hígado.

La presente invención divulga los efectos sinérgicos de una composición que comprende curcuminoides y garcinol para la protección del hígado. Una persona con conocimientos ordinarios en la técnica encontraría obvio cuando la composición mencionada se mezcla o formula con otros ingredientes, conocidos o evaluados para la protección

15 del hígado.

Otras modificaciones y variaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la divulgación y enseñanzas anteriores. El alcance de la invención se debe interpretar únicamente en relación con las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una mezcla que comprende una primera composición con 95 % p/p de curcuminoides y una segunda composición con 20 % p/p de garcinol para usar en el tratamiento terapéutico del hígado graso no alcohólico (NAFLD) en mamíferos.
- 10 2. La mezcla para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde 95 % p/p de curcuminoides y 20 % p/p de garcinol en la mezcla se administran en concentraciones de aproximadamente 10-50 mg/kg de peso corporal y 1-10 mg/kg de peso corporal, respectivamente.
3. La mezcla para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde 95 % p/p de curcuminoides están presentes en una relación de 75-81 % de curcumina, 15-19 % de demetoxicurcumina, y 2,2-6,5 % de bisdemetoxicurcumina.
- 15 4. La mezcla para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mamífero es humano.
5. La mezcla para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la mezcla se formula con excipientes y adyuvantes farmacéuticamente/nutracéuticamente aceptados y se administra por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, jarabes, gomitas, polvos, suspensiones, emulsiones, masticables, caramelos o comestibles.

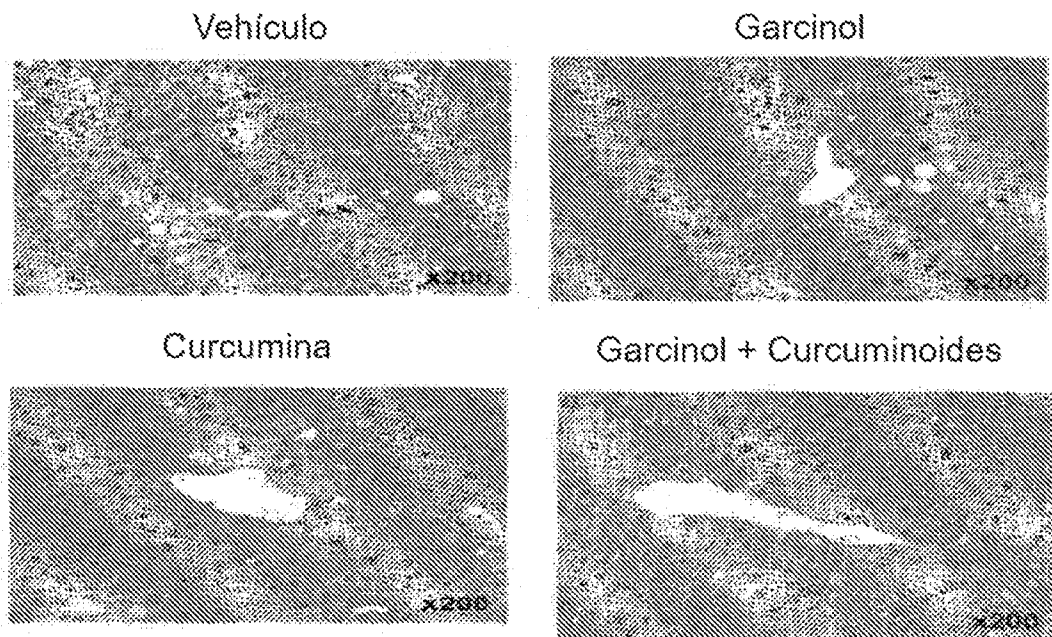


Figura 1

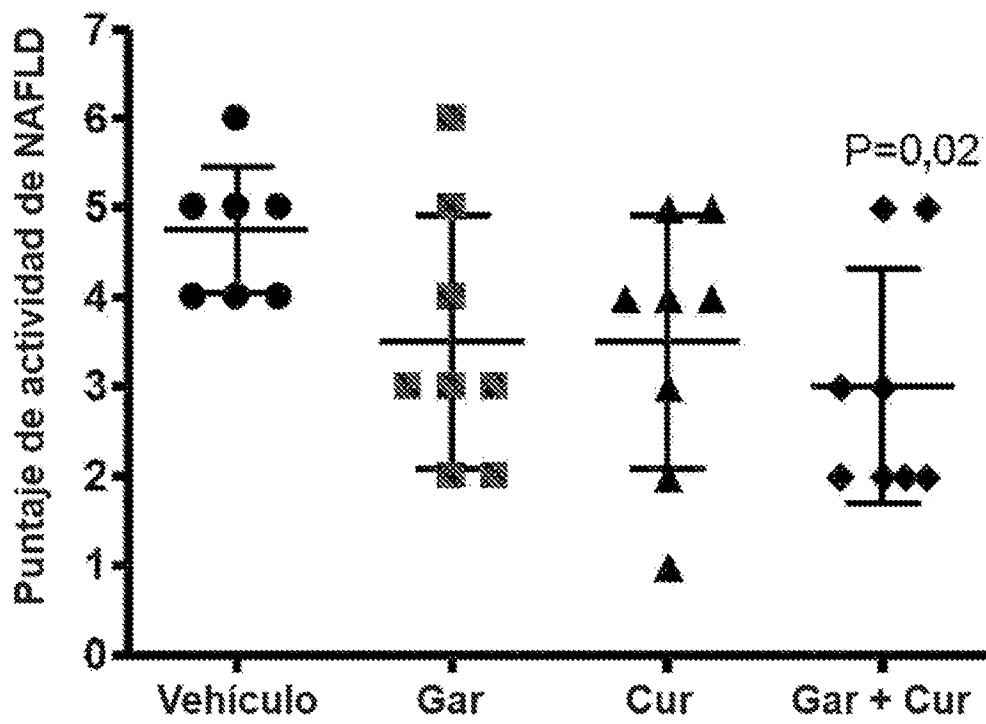


Figura 2

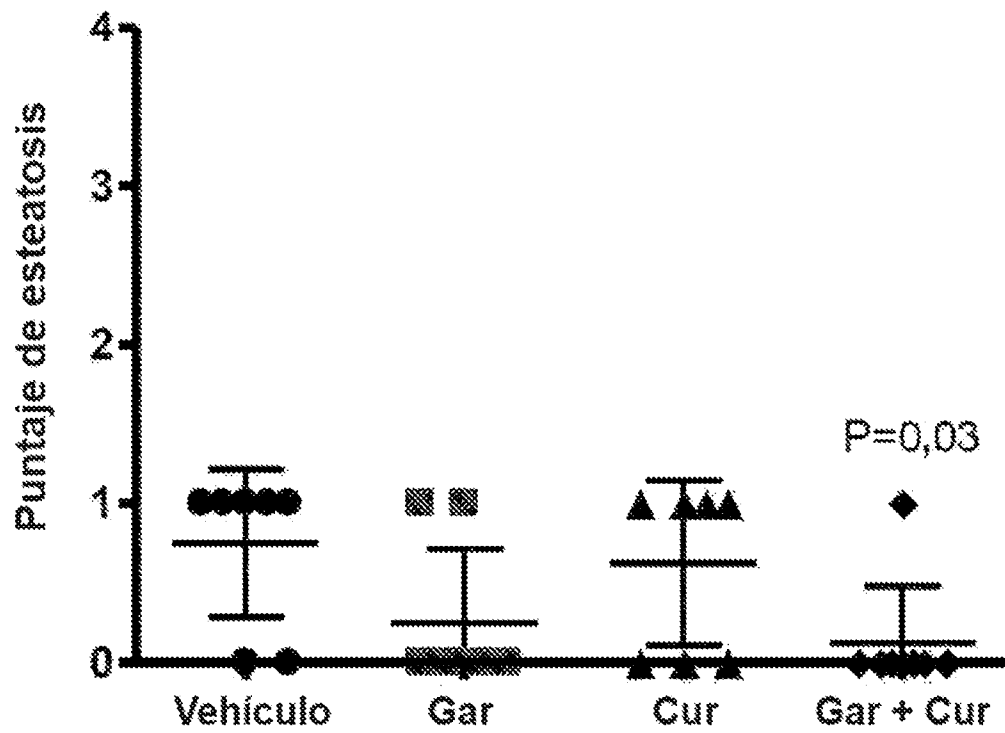


Figura 3

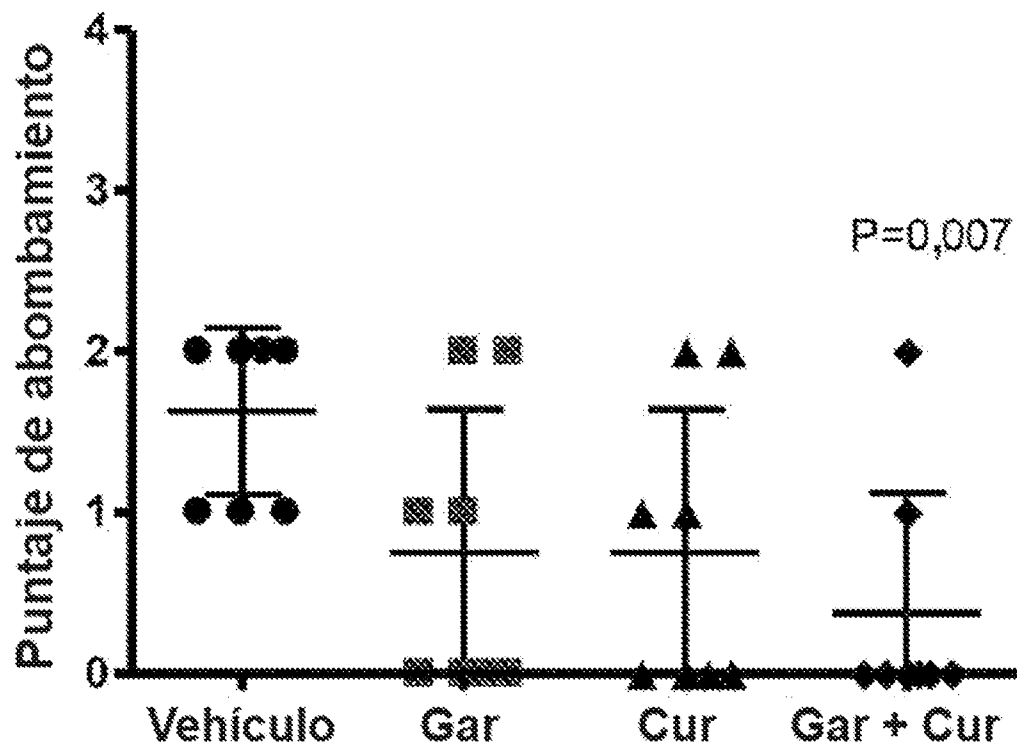


Figura 4

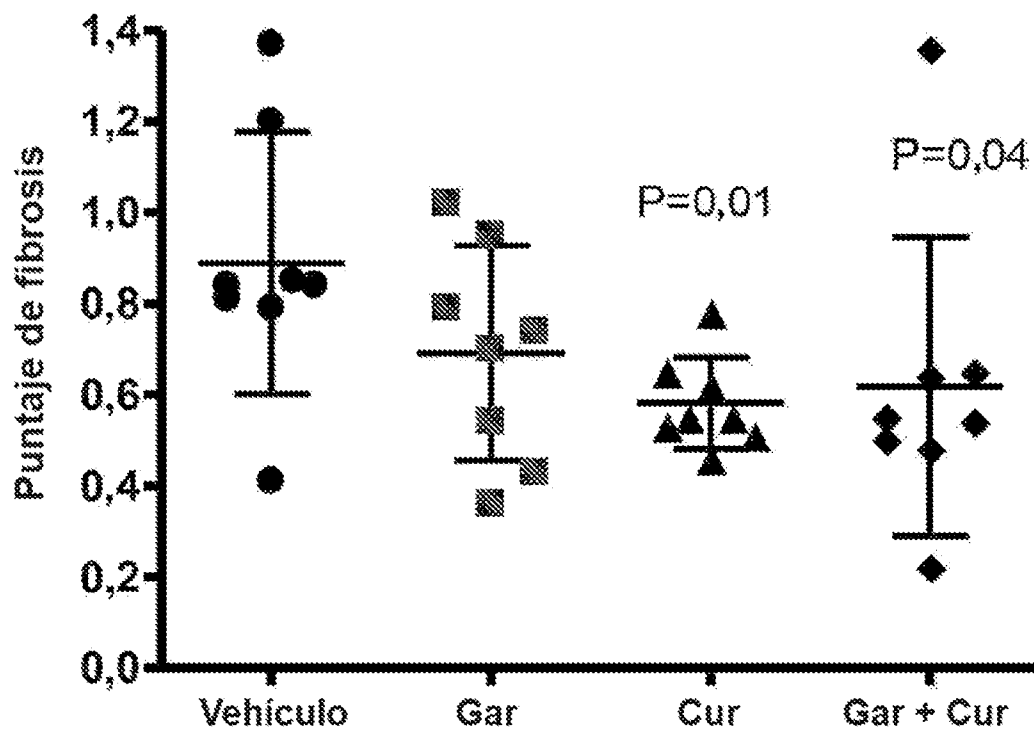


Figura 5

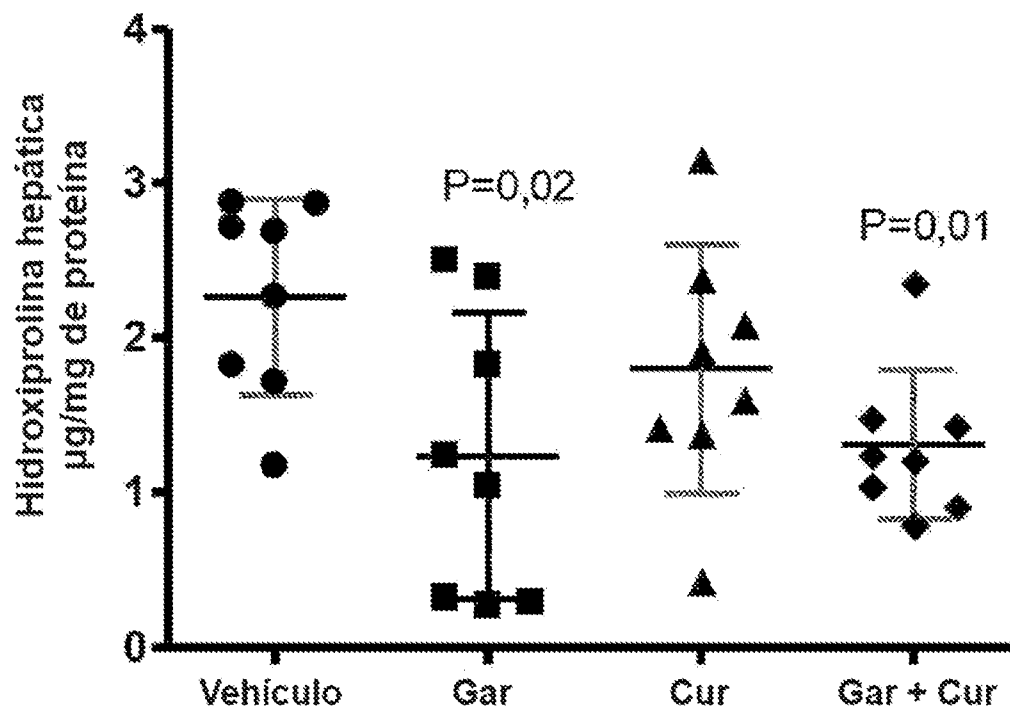


Figura 6

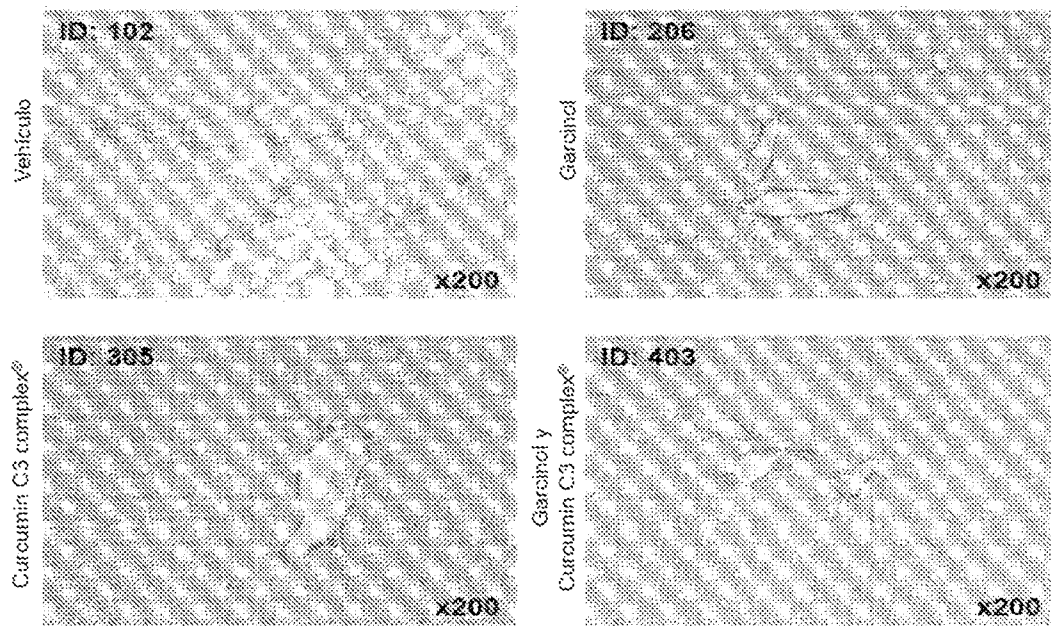


Figura 7

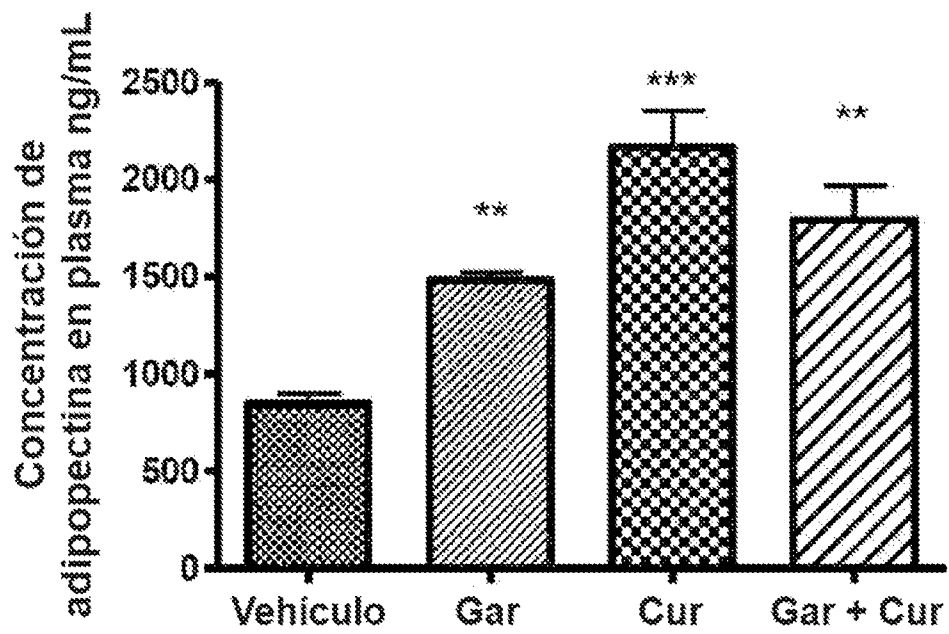


Figura 8

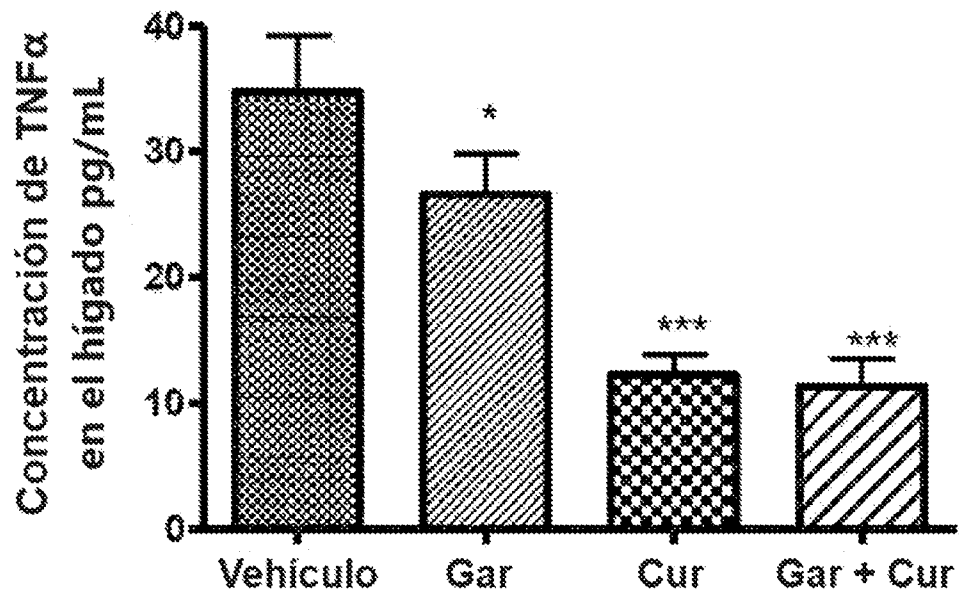


Figura 9

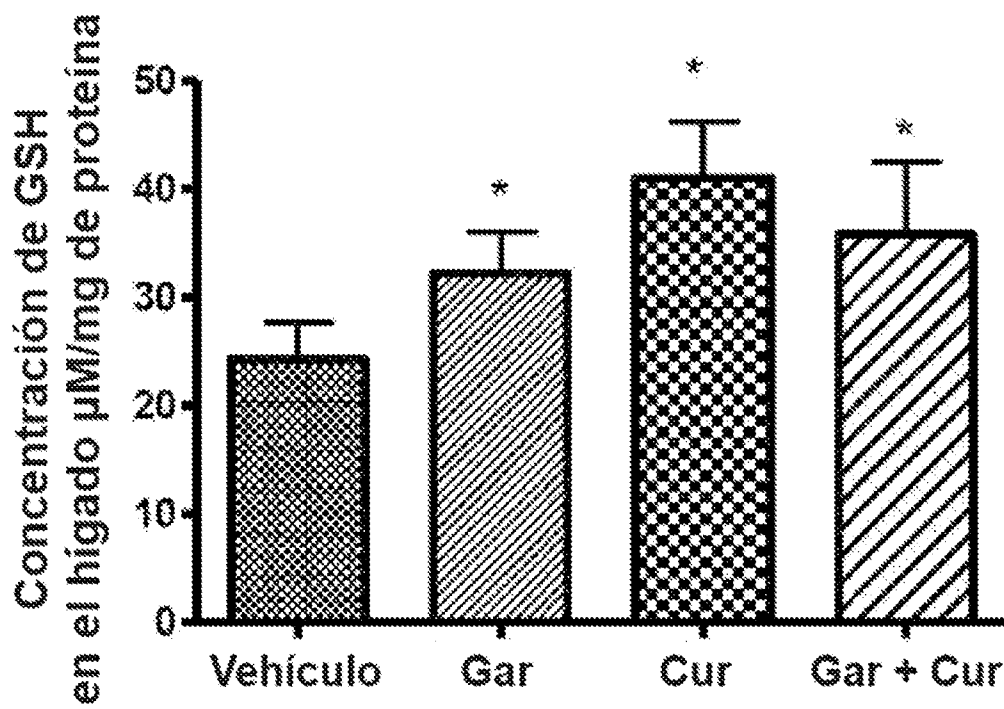


Figura 10

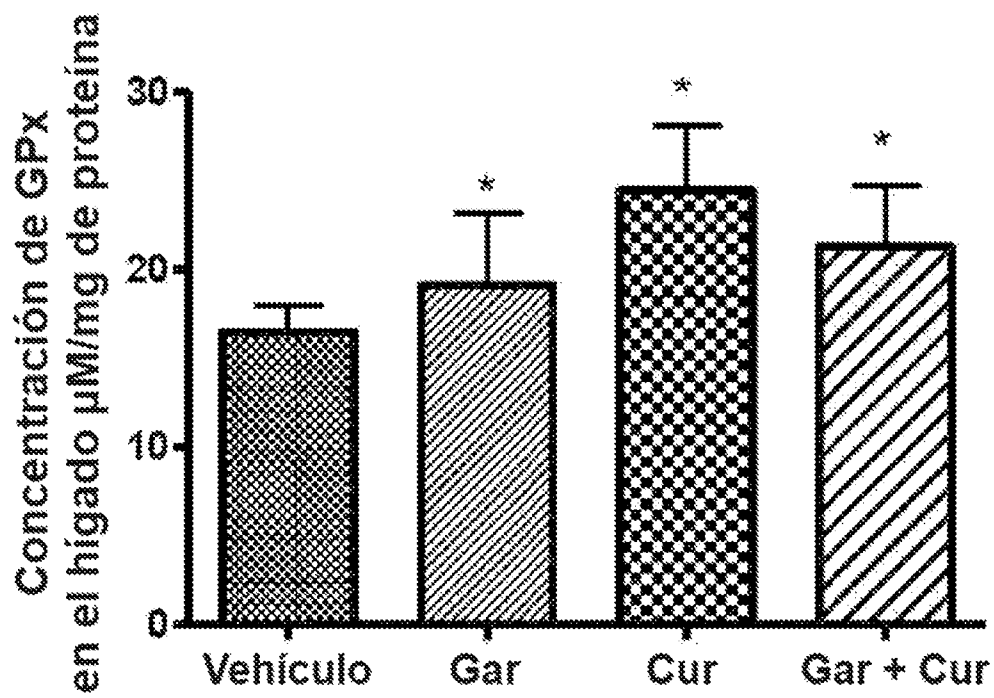


Figura 11

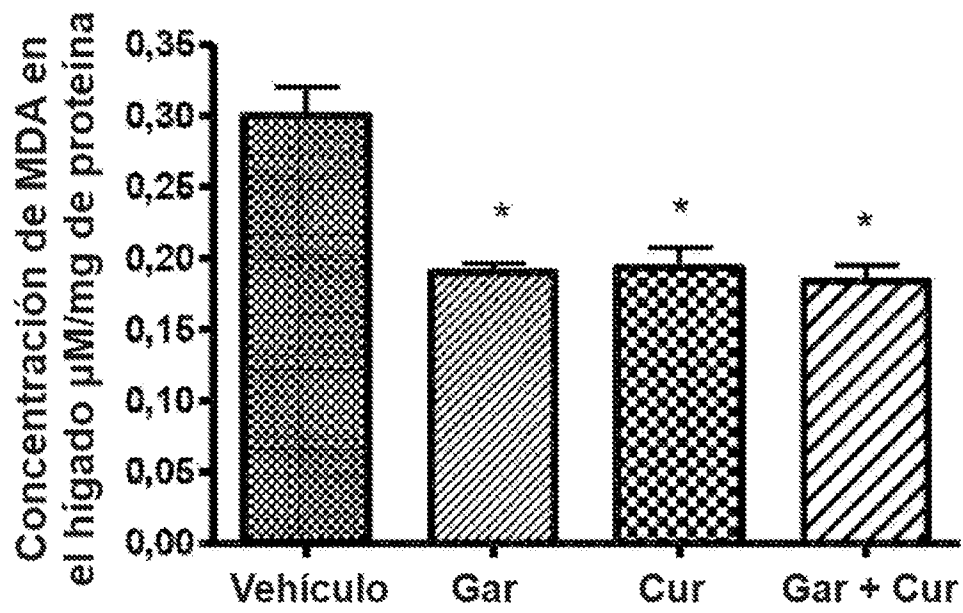


Figura 12

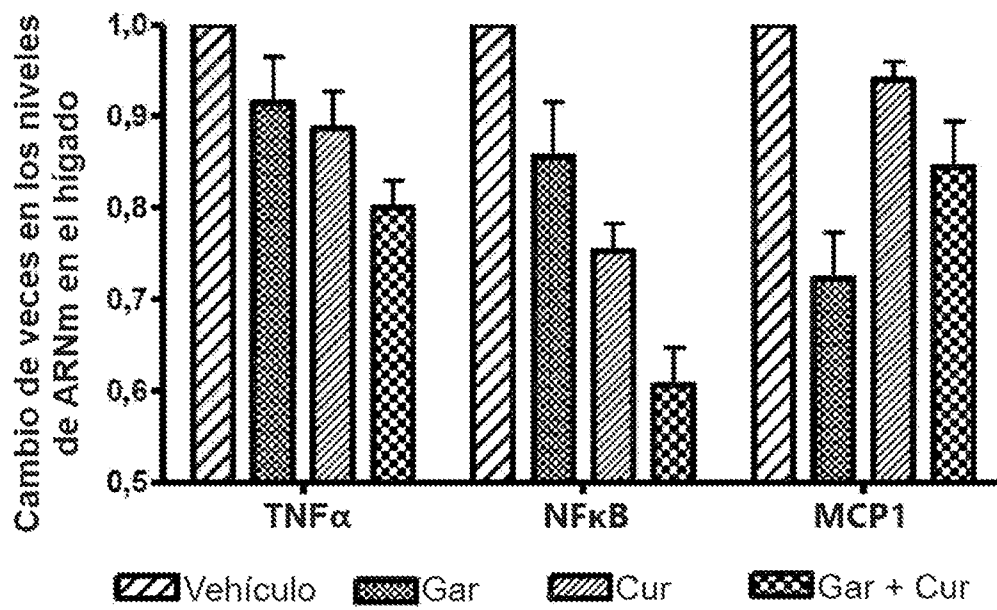


Figura 13

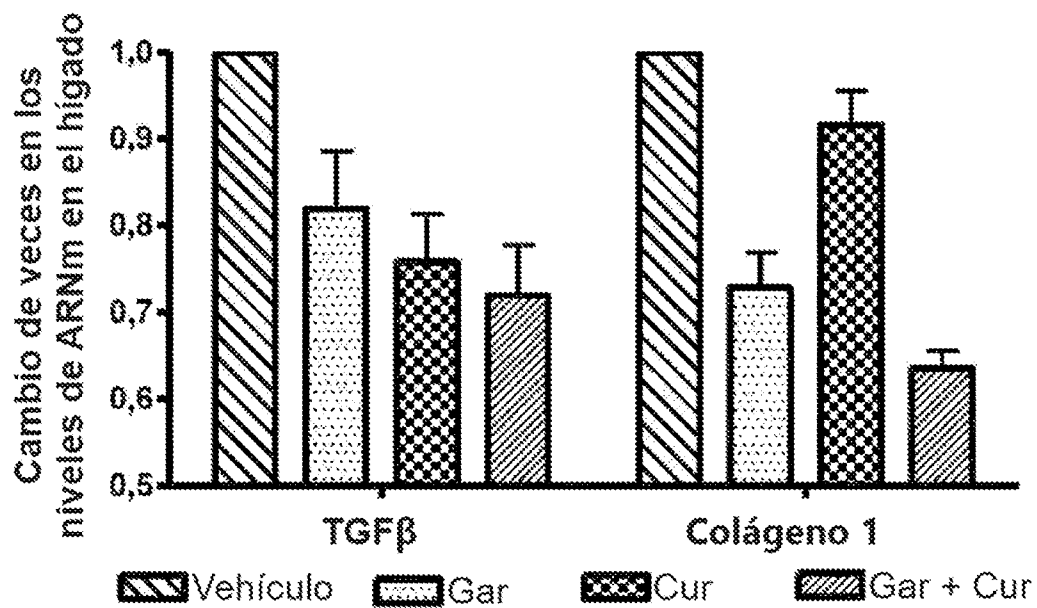


Figura 14