

COMPOSICIONES PARA ACTIVACIÓN DE NRF2 MEJORADA Y SUS MÉTODOS DE USO

SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001]Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente U. S. 62/214.175 presentada el 3 de septiembre de 2015, y la solicitud de patente U. S. 62/355.810 presentada el 28 de junio de 2016, cuyo contenido completo se incorpora en la presente por referencia en esta solicitud.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

I. Campo de la invención

[0002]La presente descripción se refiere a métodos y composiciones para prevenir o tratar determinadas condiciones de salud. Más en particular, la presente descripción se refiere a composiciones y métodos para prevenir o tratar determinadas condiciones de salud asociadas con inflamación y/o estrés oxidativo.

II. Descripción de la técnica relacionada

[0003]El factor 2 relacionado con factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) es un factor de transcripción que se regula por la proteína 1 asociada con ECH de tipo Kelch (Keap1). El Nrf2 regula la expresión génica de una amplia variedad de enzimas de detoxificación citoprotectoras de fase II y enzimas antioxidantes por medio de una secuencia mejoradora conocida como el elemento que responde a los antioxidantes (ARE) (Maher y Yamamoto 2010, Satoh, Moriguchi *et al.*, 2010). De modo relevante para el estrés oxidativo, ARE es un elemento promotor hallado en muchas enzimas antioxidantes, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), peroxirredoxinas, tiorredoxinas, catalasa, glutatión peroxidasa y hemo oxigenasa-1 (HO-1). Nrf2 desempeña un papel fundamental en el sistema de defensa celular manejado por ARE contra el estrés oxidativo. Véase, Kensler, Wakabayashi *et al.* 2010; Hybertson y Gao 2014, Bocci y Valacchi 2015, Huang, Li *et al.* 2015, Johnson y Johnson 2015, Moon y Giaccia 2015, Petiwala y Johnson 2015, Sekhar y Freeman 2015, Suzuki y Yamamoto 2015.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0004]Las instrumentalidades reveladas en la presente adelantan en la técnica al suministrar combinaciones de agentes que activan la vía de señalización de células Nrf2. En una forma de realización, las combinaciones de agentes pueden activar la vía de Nrf2 de forma más eficaz que los agentes individuales. En otra forma de realización, las combinaciones de agentes pueden activar la vía de Nrf2 sinérgicamente.

[0005]En una forma de realización, las combinaciones de más de un ingrediente se revelan aquí. En un aspecto, cada ingrediente puede contener uno o varios

productos fitoquímicos. En otro aspecto, estos productos fitoquímicos se pueden hallar en romero (*Rosmarinus officinalis*), jengibre (*Zingiber officinale*), luteolina (de *Sophora Japonica*), cardo lechero (*Silybum marianum*) y bacopa (*Bacopa monnieri*). En otro aspecto, los componentes de los productos fitoquímicos son carnosol, shogaol, luteolina, silimarina y bacósidos, que se pueden hallar en romero, jengibre, luteolina, cardo lechero y bacopa, respectivamente. En otro aspecto, las composiciones reveladas inducen los genes antioxidantes regulados por ARE por la vía dependiente de Nrf2.

[0006]En otra forma de realización, se revelan combinaciones específicas de romero, ashwagandha y luteolina (mencionadas en la presente como PB125), combinaciones específicas de romero, jengibre, luteolina y silimarina (mencionadas en la presente como PB127) y combinaciones específicas de romero, jengibre, luteolina, silimarina y bacopa (mencionadas en la presente como PB129). En otra forma de realización, la combinación de estos agentes puede dar como resultado una activación sinérgica de Nrf2, mayor que simplemente la suma de sus contribuciones de activación de Nrf2 individuales. Los agentes activos o combinaciones de los agentes pueden ser candidatos de posible desarrollo de fármacos. Véase, por ejemplo, Koehn y Carter 2005, Lee 2010.

[0007]En otra forma de realización, las composiciones reveladas pueden contener romero (carnosol), jengibre (6-shogaol y 6-gingerol), ashwagandha (witaferina A), cardo lechero (silimarina), *Bacopa monnieri* (bacósidos) y luteolina.

[0008]En un aspecto, las composiciones se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de un comprimido, cápsula, gel blando, jarabe, solución o suspensión acuosa, extracto de alcohol o polvo. En otro aspecto, las composiciones sinérgicas se pueden administrar en forma de aerosol, por ejemplo, a los pulmones en forma de una neblina o polvo de aerosol fino que se inhala y se deposita parcialmente dentro de las vías respiratorias pulmonares. En otro aspecto, las composiciones reveladas se pueden administrar por administración local, por ejemplo, por aplicación a la piel en forma de una loción, gel, ungüento, pulverizador acuoso o dentro de un vendaje aplicado a la piel o a una herida.

[0009]En otra forma de realización, la composición revelada puede contener una combinación de extracto de romero (especificado al 5 a 10 % de carnosol), extracto de jengibre (especificado al 1-10 % de 6-shogaol y/o 10-25 % de 6-gingerol) y luteolina (especificada al 95-98 % de luteolina), en la relación en masa de 10:5:1, respectivamente. Esta fórmula también se menciona como PB123 en esta revelación.

[0010]En otra forma de realización, la composición revelada puede contener una combinación de extracto de romero (especificado al 5 a 10% de carnosol), extracto

de ashwagandha (especificado al 1-3% de witaferina A) y luteolina (especificada al 95-98% de luteolina), en la relación en masa de 30:10:4, respectivamente. Esta fórmula también se puede mencionar como PB125 en esta revelación.

[0011]En otra forma de realización, la composición revelada puede contener una combinación de extracto de romero (especificado al 5 a 10 % de carnosol), extracto de jengibre (especificado al 1-10 % de 6-shogaol y/o 10-25 % de 6-gingerol), luteolina (especificada al 90-100 % de luteolina) y extracto de cardo lechero (especificado al 50-90 % de silimarina), en la relación en masa de 10:5:1:30, respectivamente. Esta fórmula también se puede mencionar como PB127 en esta revelación.

[0012]En otra forma de realización, la composición revelada puede contener una combinación de extracto de romero (especificado al 5 a 10 % de carnosol), extracto de jengibre (especificado al 1-10 % de 6-shogaol y/o 10-25 % de 6-gingerol), luteolina (especificada al 90-100 % de luteolina), extracto de cardo lechero (especificado al 50-90 % de silimarina) y extracto de Bacopa monnieri (especificado al 10-60 % de bacósidos) en la relación en masa de 10:5:1:30:48, respectivamente. Esta fórmula también se puede mencionar como PB129 en esta revelación.

[0013]En otra forma de realización, la composición revelada puede contener una combinación de extracto de romero (especificado al 5 a 10 % de carnosol), extracto de jengibre (especificado al 1-10 % de 6-shogaol y/o 10-25 % de 6-gingerol), luteolina (especificada al 90-100 % de luteolina) y extracto de Bacopa monnieri (especificado al 10-60 % de bacósidos) en la relación en masa de 10:5:1:48, respectivamente. Esta fórmula también se puede mencionar como PB131 en esta revelación.

[0014]En otra forma de realización, PB123 se puede administrar a 10 a 1000 mg por día como una administración oral a un ser humano. Por ejemplo, se puede administrar como una píldora, gel blando o cápsula para inducir la activación de Nrf2, y/o para reducir la inflamación y el estrés oxidativo, y/o para mejorar la salud y bienestar en general.

[0015]En otra forma de realización, PB123 se puede administrar a 10 a 1000 mg por día como una administración oral a un ser humano para mejorar la homeostasis de las proteínas, y/o para evitar problemas relacionados con el envejecimiento que están asociados con la homeostasis de las proteínas y/o autofagia en seres humanos.

[0016]En otra forma de realización, PB125 o PB127 o PB129 o PB131 se pueden administrar a 10 a 1000 mg por día como una administración oral a un ser humano. Por ejemplo, se pueden administrar como una píldora, gel blando o cápsula para inducir activación de Nrf2, y/o para reducir la inflamación y el estrés oxidativo, y/o

para mejorar la salud y bienestar en general.

[0017]En otra forma de realización, PB125 o PB127 o PB129 o PB131 se puede administrar a 10 a 1000 mg por día como una administración oral a un ser humano para mejorar la homeostasis de las proteínas, y/o para evitar problemas relacionados con el envejecimiento que están asociados con la homeostasis de las proteínas y/o autofagia en seres humanos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0018]La Figura 1 muestra las vías de activación de Nrf2 y los puntos de control.

[0019]La Figura 2 muestra la desactivación de Nrf2 nuclear dependiente de “vía de cierre”-Fyn.

[0020]La Figura 3 muestra la degradación de “ciclo de retroalimentación positiva”-Keap1 por productos génicos inducidos por Nrf2.

[0021]La Figura 4 muestra la activación de Nrf2 inducida por PB123, PB125, PB127, PB129 y PB131 en una línea de células de cáncer de mama transfectadas.

[0022]La Figura 5 muestra la activación de Nrf2 inducida por PB123, PB125, PB127, PB129 y PB131 en una línea de células de cáncer hepático transfectadas.

[0023]La Figura 6A-6C muestra el efecto sinérgico de la activación de Nrf2 inducida por PB129 en líneas de células de cáncer HepG2 (hígado humano, Fig. 6A), MCF7 (mama humana, Fig. 6B) y A172 (cerebro humano, Fig. 6C).

[0024]La Figura 7A-7C muestra el efecto sinérgico de la activación de Nrf2 inducida por PB127 en líneas de células de cáncer HepG2 (hígado humano, Fig. 7A), MCF7 (mama humana, Fig. 7B) y A172 (cerebro humano, Fig. 7C).

[0025]La Figura 8 muestra el incremento de la expresión génica de HMOX1 de hígado de ratón *in vivo*.

[0026]La Figura 9 muestra la actividad de catalasa hepática inducida por PB125 en dieta.

[0027]La Figura 10 muestra la superposición de unidades relativas de luz (RLU) observadas con luciferina añadida después de inducir la expresión génica de luciferasa accionada por ARE mediante el tratamiento con PB125 en líneas de células de cáncer establemente transfectadas HepG2 (hígado humano), AREc32 (mama humana), MCF7 (mama humana), A549 (pulmón humano), 293T (riñón humano) y A172 (cerebro humano). Se observó fuerte activación de Nrf2 en líneas de células de hígado, riñón y mama por 5, 10, 15, 20 y 25 microgramos de PB125 por ml de solución de cultivo.

[0028]La Figura 11 muestra que PB125 reduce la expresión inducida por LPS de genes inflamatorios.

[0029]La Figura 12 muestra que PB125 reduce la expresión de IL-6 inducida por LPS.

[0030] La Figura 13 muestra mayor expresión génica de GCLM como resultado de la administración de PB125.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0031] La vía de Nrf2/ARE fue implicada en el control de estrés oxidativo (Eggler, Gay *et al.* 2008, Cho y Kleeberger 2010, Huang, Li *et al.* 2015, Johnson y Johnson 2015). Determinados agentes y combinaciones de tales agentes (por ejemplo, PB125) que se dirigen a la vía de Nrf2/ARE pueden tener efectos beneficiosos sobre la función y la supervivencia celular. En una forma de realización, estos agentes y sus combinaciones pueden aliviar las respuestas inflamatorias y el estrés oxidativo y pueden tener efectos beneficiosos sobre la salud y el bienestar.

[0032] Estudios previos han fallado al demostrar el potencial terapéutico de vitaminas o suplementos antioxidantes directos tales como vitaminas C y E, carotenoides, N-acetilcisteína y otros compuestos que reaccionan estequiométricamente con especies de oxígeno reactivo (ROS) tales como superóxido y peróxido de hidrógeno. Aquí, se demuestran una defensa antioxidante mejorada usando combinaciones activantes de Nrf2 (Koehn 2006, Eggler, Gay *et al.* 2008, Boutten, Goven *et al.* 2010, Cho y Kleeberger 2010).

[0033] En la presente descripción, se combinaron una multiplicidad de agentes en una nueva vía, es decir, al actuar en diferentes puntos de control en vía de activación de Nrf2. La Figura 1 muestra las vías de activación de Nrf2 y los puntos de control A, B, C, D y E en los que bajas concentraciones de agentes que actúan en esos puntos de control trabajan juntas para efectuar la expresión génica dependiente de Nrf2 deseada mediante combinaciones tales como PB125, PB127 y PB129. En el estado basal, Nrf2 se secuestra y se mantiene inactiva mediante la proteína asociada con ECH de tipo Kelch 1 (Keap1), que se dirige a Nrf2 para la poliubiquitinación y degradación por el proteasoma. A. La activación de Nrf2 implica la oxidación de residuos específicos de tiol de Keap1, causando que Nrf2 sea liberado de Keap1. B. La fosforilación de Nrf2 puede desempeñar un papel en su direccionamiento para importación nuclear. C. La translocación de Nrf2 en el núcleo permite que Nrf2 se una con los promotores que contienen el elemento de respuesta a antioxidantes (ARE), iniciando la transcripción de la programación citoprotectora. D. Fyn citosólico inactivo se puede fosforilar por GSK3 β y este p-Fyn ahora activo se transloca en el núcleo, donde puede fosforilar Nrf2 en un segundo sitio para dar como resultado la exportación nuclear y la degradación. E. Un “ciclo de retroalimentación positiva” implica SESN2, SQSTM1 y ULK1, productos génicos inducidos por Nrf2. SESN2, SQSTM1 y ULK1 colaboran para activar la autofagia de Keap1, liberando más Nrf2, que induce más de estos productos génicos, tendiendo a mantener la activación de Nrf2 una vez que se haya disparado este ciclo de

retroalimentación positiva.

[0034] También en la presente descripción, las combinaciones de agentes dieron sorprendentemente unos altos niveles de activación de Nrf2 en comparación con lo que se pronosticará en base a la técnica anterior y también en base a experimentos actuales que examinan las propiedades activantes de Nrf2 de cada agente solo y lo que se pronosticará en base a la adición de ellos juntos. La activación de Nrf2 por la combinación de los agentes muestran un efecto sinérgico. Véase, por ejemplo, las Figuras 6 y 7.

[0035] Una forma de realización de la presente descripción comprende combinaciones de agentes dietarios –tales como en las combinaciones de PB125, PB127 y PB129- que actúan sobre la activación de Nrf2 mediante enganche de diferentes puntos de control específicos como la combinación de agentes que activan sinérgicamente la vía de Nrf2. Así, las nuevas combinaciones de agentes que actúan sobre diferentes puntos de control de la vía de señalización de Nrf2 para incrementar la expresión de genes dependientes de Nrf2 son nuevas.

[0036] A modo de ejemplo, se enumera una cantidad de formas de realización de la presente descripción a continuación:

[0037] Ítem 1. Una composición que comprende dos o más productos fitoquímicos seleccionados del grupo que consiste en carnosol, ácido carnósico, shogaol, gingerol, luteolina y witaferina A, donde dichos uno o más productos fitoquímicos están presentes en la composición en una cantidad eficaz para activar la vía de Nrf2 (factor 2 relacionado con factor nuclear eritroide 2).

[0038] Ítem 2. La composición de acuerdo con el ítem 1, en donde los dos o más productos fitoquímicos ejercen sus efectos sobre al menos dos puntos de control diferentes de la vía de activación de Nrf2 cuando se administran a un mamífero, donde dichos puntos de control están seleccionados del grupo que consiste en los puntos de control A, B, C, D y E. En una forma de realización, al menos uno de los productos fitoquímicos ejerce sus efectos sobre un punto de control, mientras que al menos otro producto fitoquímico ejerce sus efectos sobre un diferente punto de control de la vía de activación de Nrf2 como se representa en la Fig. 1.

[0039] Ítem 3. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde los dos o más productos fitoquímicos tienen un efecto sinérgico sobre la activación de Nrf2 cuando se administran a un mamífero.

[0040] Ítem 4. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde la composición comprende al menos dos ingredientes seleccionados del grupo que consiste en romero, jengibre, luteolina y ashwagandha.

[0041] Ítem 5. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems

precedentes, en donde la composición también comprende uno o más productos fitoquímicos seleccionados del grupo que consiste en cardo lechero y bacopa.

[0042]Ítem 6. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde la composición comprende extracto de romero, extracto de jengibre y luteolina, donde dicho extracto de romero está especificado al 5-10 % de carnosol, donde dicho extracto de jengibre está especificado al 10-20 % de 6-shogaol, donde dicha luteolina está especificada al 95-99 % de luteolina, en donde la relación entre extracto de romero, extracto de jengibre y luteolina en la composición es de aproximadamente 10:5:1 (p/p).

[0043]Ítem 7. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde la composición comprende extracto de romero, extracto de ashwagandha y luteolina, donde dicho extracto de romero está especificado al 5-10 % de carnosol, dicho extracto de ashwagandha está especificado al 1-3 % de witaferina A, donde dicha luteolina está especificada al 95-99 % de luteolina, en donde la relación entre dicho extracto de romero, extracto de ashwagandha y luteolina en la composición es de aproximadamente 30:10:4 (p/p).

[0044]Ítem 8. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde la composición comprende extracto de romero, extracto de jengibre y luteolina y en donde la relación entre dicho extracto de romero, extracto de jengibre y luteolina es de aproximadamente 10:5:1 (p/p).

[0045]Ítem 9. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde la composición comprende extracto de romero, extracto de ashwagandha y luteolina, en donde la relación entre dicho extracto de romero, extracto de ashwagandha y luteolina es de aproximadamente 30:10:4 (p/p).

[0046]Ítem 10. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde la composición comprende extracto de romero, extracto de jengibre, luteolina y extracto de cardo lechero, en donde la relación entre dicho extracto de romero, extracto de jengibre, luteolina y extracto de cardo lechero es de aproximadamente 10:5:1:30 (p/p).

[0047]Ítem 11. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde la composición comprende extracto de romero, extracto de jengibre, luteolina, extracto de cardo lechero y extracto de Bacopa monnieri, donde la relación entre dicho extracto de romero, extracto de jengibre, luteolina, extracto de cardo lechero y extracto de Bacopa monnieri es de aproximadamente 10:5:1:30:48 (p/p).

[0048]Ítem 12. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde la composición comprende extracto de romero, extracto de jengibre, luteolina y extracto de Bacopa monnieri, en donde la relación entre dicho

extracto de romero, extracto de jengibre, luteolina y extracto de *Bacopa monnieri* es de aproximadamente 10:5:1:48 (p/p).

[0049]Ítem 13. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde la composición se usa para prevenir y/o tratar una enfermedad o una condición seleccionada del grupo que consiste en estrés oxidativo, detoxificación, inflamación, cáncer o una enfermedad o condición relacionada.

[0050]Ítem 14. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde la composición se usa como un suplemento nutricional.

[0051]Ítem 15. La composición de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde la composición está en la forma de un comprimido, una cápsula, un gel blando, un líquido, una loción, un gel, un polvo, un ungüento o un aerosol.

[0052]Ítem 16. Un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad o condición, que comprende la etapa de administración de una composición a un mamífero, donde la composición comprende uno o más productos fitoquímicos seleccionados del grupo que consiste en carnosol, ácido carnósico, shogaol, gingerol, luteolina y witaferina A, donde dichos uno o más productos fitoquímicos están presentes en la composición en una cantidad eficaz para activar la vía de Nrf2 (factor 2 relacionado con NF-E2).

[0053]Ítem 17. El método de acuerdo con cualquiera de los ítems precedentes, en donde la composición comprende extracto de romero, extracto de ashwagandha y luteolina, en donde el extracto de romero está especificado al 5-10 % de carnosol, el extracto de ashwagandha está especificado al 1-3 % de witaferina A y la luteolina está especificada al 95-99 % de luteolina, en donde la relación entre dicho extracto de romero, extracto de ashwagandha y luteolina es de aproximadamente 30:10:4 (p/p).

[0054]Ítem 18. El método de acuerdo con el ítem 17, en donde la composición comprende extracto de romero, extracto de jengibre y luteolina, en donde el extracto de romero está especificado al 5-10 % de carnosol, el extracto de jengibre está especificado al 10-20 % de 6-shogaol y la luteolina está especificada al 95-99 % de luteolina, en donde la relación entre dicho extracto de romero, extracto de jengibre y luteolina es de aproximadamente 10:5:1 (p/p).

[0055]Ítem 19. El método de acuerdo con cualquiera de los ítems 17-18, en donde la composición se administra por vía oral a un ser humano a 10-1000 mg por día.

[0056]Ítem 20. El método de acuerdo con cualquiera de los ítems 17-19, en donde la composición comprende al menos dos productos fitoquímicos

seleccionados del grupo que consiste en carnosol, ácido carnósico, shogaol, gingerol, luteolina y witaferina A, en donde los al menos dos productos fitoquímicos ejercen sus efectos sobre al menos dos diferentes puntos de control de la vía de activación de Nrf2, donde dichos puntos de control están seleccionados del grupo que consiste en los puntos de control A, B, C, D y E.

[0057] Será fácilmente obvio para los expertos en la técnica que las composiciones y los métodos descritos en la presente se pueden modificar y se pueden hacer sustituciones usando equivalentes apropiados sin apartarse del alcance de las formas de realización reveladas en la presente. Habiendo descrito ahora determinadas formas de realización en detalle, lo mismo será comprendido más claramente por referencia a los siguientes ejemplos que se incluyen con fines solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Efectos sobre las vías de acción de Nrf2

[0058] Los diferentes agentes, PB123, PB125, PB127, PB129 y PB131, exhiben cada uno una fuerte y potente activación de Nrf2 según se demuestra *in vitro* usando estas combinaciones para tratar líneas de células que fueron establemente transfectadas con un constructo promotor/reportero que contiene un elemento de respuesta antioxidante de unión a Nrf2 conocido insertado para accionar la producción del gen de luciferasa fácilmente detectable de modo tal que la activación de Nrf2 da como resultado la producción de luciferasa que se detecta por quimioluminiscencia dependiente de luciferina. Como se muestra en las Figuras 4 y 5, se induce una potente activación de Nrf2 por las combinaciones de PB123, PB125, PB127, PB129 y PB131 en líneas de células de cáncer transfectadas independientes del tipo de tejido (se muestran datos de células de mama y de hígado).

[0059] Estos puntos de control incluyen, pero sin limitación, punto de control A: liberación de Nrf2 de la unión y la inhibición por Keap1; punto de control B: acción sobre Nrf2 por enzimas tales como quinasas que fosforilan y activan Nrf2; punto de control C: activación de otros factores de transcripción que mejoran el perfil de expresión génica; punto de control D: acción sobre los mecanismos de modo que Fyn controla la exportación de Nrf2 del núcleo; y punto de control E: degradación de Keap1 e inhibición de mTOR por SESN2/SQSTM1/ULK1. Véase la Figura 1. Por ejemplo, la combinación de PB125 que incluye romero (carnosol), ashwagandha (witaferina A) y luteolina actúa en múltiples puntos de control en la vía de activación de Nrf2. En las células HepG2 establemente transfectadas con un gen reportero de luciferasa accionado por ARE inhibimos Fyn (con 5 µg/ml de saracatinib; AZD0530, un inhibidor de quinasa de la familia Src (Kaufman, Salazar *et al.* 2015)) y

mostramos que la inhibición de Fyn aumentó la activación de Nrf2 causada por otro activador de Nrf2 del suplemento dietario (Protandim) hasta 9 veces. Por el contrario, la inhibición de Fyn no aumentó mayor activación de Nrf2 inducida por PB125, que confirma que, mientras que otros activadores de Nrf2 dietarios como Protandim permiten la “vía de cierre” para permanecer activos, PB125 parece bloquear la vía, lo que permite la activación de Nrf2 por medio de una menor cantidad de la combinación de suplemento dietario de PB125.

[0060] Al actuar sobre más de uno de los puntos de control, una combinación de agentes como PB123 o PB125, junto con combinaciones relacionadas a base de las tríadas de activadores nucleares de Nrf2 en PB123 o PB125, tales como PB127, PB129 o PB131 brinda una activación de Nrf2 mejorada y una respuesta de regulación génica y lo hace en menores dosis que lo pronosticado en base a propiedades conocidas de los agentes activos en las combinaciones y en base a lo que se enseña en la técnica anterior. Los ingredientes activos en PB123, 125, PB127, PB129 y PB131 actúan juntos en una manera sinérgica, donde la cantidad de activación de Nrf2 y la expresión génica dependiente de Nrf2 es mayor para los ingredientes combinados que lo pronosticado en base a la suma de sus actividades individuales sobre Nrf2 en las mismas concentraciones, incluso en diferentes tipos celulares (Figuras 6 y 7). Uno de los hallazgos sorprendentes era que cantidades relativamente pequeñas de luteolina añadidas a los otros ingredientes daban un aumento mayor que el esperado en la activación de Nrf2 y la regulación génica.

[0061] Una combinación de romero (6,7 % de carnosol), ashwagandha (1 % de witaferina A) y luteolina (98 % de luteolina) de PB125 (a 30:10:4 romero:ashwagandha:luteolina) incrementó la expresión génica dependiente de Nrf2 en ratones alimentados 35 días con PB125 añadido a la comida de ratones. Véase las Figuras 8 y 9.

[0062] Los componentes fitoquímicos de PB125 se estandarizan, con extracto de romero (especificado al 6 % de carnosol), extracto de ashwagandha (especificado al 1 % de witaferina A) y luteolina (especificada al 98 % de pureza), de modo que 100 ppm es igual a $6,83 \times 10^{-5}$ mg de extracto de romero, $2,27 \times 10^{-5}$ mg de extracto de ashwagandha y $9,43 \times 10^{-6}$ mg de luteolina por gramo de dieta. PB125 en la dieta de ratones activa la vía de Nrf2 (por ejemplo, mayor expresión génica de hmox1 en hígado de ratón) y aumenta la actividad de la catalasa. Las dosis de PB125 eran bien toleradas por los ratones según se evidencia por ningún cambio en comparación con la dieta de control en la estabilidad en peso, ingesta de comida consistente y ningún distrés del GI remarcable o cambios de comportamiento. Los 100 ppm de dieta de PB125 producían aumentos significativos en la expresión génica de hmox1 en hígado en ratones (medida después de 35 días de consumo de

dieta) (Figura 8).

[0063] Los ingredientes individuales en PB125, PB127 y PB129 tienen una larga historia de consumo humano y seguridad probada tanto en estudios en humanos como en estudios en animales (Saller, Meier *et al.* 2001, Roodenrys, Booth *et al.* 2002, Aggarwal, Takada *et al.* 2004, Boon and Wong 2004, Anadon, Martinez-Larranaga *et al.* 2008, Zick, Djuric *et al.* 2008, Johnson 2011, Chandrasekhar, Kapoor *et al.* 2012, Theoharides, Asadi *et al.* 2012, Taliou, Zintzaras *et al.* 2013, Zhang, Gan *et al.* 2013, Gonzalez-Vallinas, Reglero *et al.* 2015, Kumar, Srivastava *et al.* 2015, Nabavi, Braidy *et al.* 2015, Petiwala and Johnson 2015). Romero, ashwagandha, jengibre, cardo lechero, Bacopa monnieri y luteolina fueron estudiados extensamente en diversas enfermedades y tienen un registro extenso de uso seguro (Mishra, Singh *et al.* 2000, Roodenrys, Booth *et al.* 2002, Aggarwal, Takada *et al.* 2004, Boon and Wong 2004). El romero (*Rosmarinus officinalis*) es una hierba mediterránea común ampliamente consumida en alimentos como una especia y agente saborizante. Además, el romero tiene una larga historia de uso en terapias tradicionales para el tratamiento de una variedad de trastornos [1], con énfasis en beneficios antiinflamatorios (Emami, Ali-Beig *et al.* 2013), antioxidantes (Klancnik, Guzej *et al.* 2009, Raskovic, Milanovic *et al.* 2014, Ortuno, Serrano *et al.* 2015) y antimicrobianos (Del Campo, Amiot *et al.* 2000, Bozin, Mimica-Dukic *et al.* 2007). Ashwagandha (*Witania somnifera*, también conocida como cereza de invierno de la India o ginseng de la India) es un miembro de la familia de las solanáceas de plantas florales. Se ha utilizado durante siglos en Asia del sur en terapias tradicionales, con énfasis histórico y actual sobre beneficios inmunomoduladores (Khan, Subramanayaan *et al.* 2015), antitumorales (Rai, Jogee *et al.* 2016), neurológicos (Raghavan y Shah 2015), antiinflamatorios (Kumar, Srivastava *et al.* 2015), antioxidantes (Priyandoko, Ishii *et al.* 2011) y otros beneficios (Wankhede, Langade *et al.* 2015). El jengibre tiene una larga historia de uso seguro para el dolor, GI y condiciones relacionadas con el envejecimiento, con evidencia de beneficio contra estrés oxidativo (Wang, Zhang *et al.* 2014, Lakhan, Ford *et al.* 2015, Wilson 2015). Silimarina tiene un buen perfil de seguridad (Saller, Meier *et al.* 2001, Jacobs, Dennehy *et al.* 2002) incluso en aquellos con cirrosis, e incluso en altas dosis (de hasta 900 mg por día) que son mucho mayores que las usadas en PB127 o PB129. Bacopa monnieri probó ser segura en estudios en seres humanos de pérdida de memoria en dosis mayores que las usadas en PB129 y estudios en animales no demostraron ninguna toxicidad adversa para cualquiera de sus componentes (Mishra, Singh *et al.* 2000, Roodenrys, Booth *et al.* 2002). Luteolina es un compuesto de flavona bioflavanoide comúnmente consumido en la dieta humana de múltiples fuentes de alimento (por ejemplo, cebollas, té, manzanas, brócoli, olivas, apio,

espinaca, naranjas, orégano, etc.), lo que da como resultado una ingesta dietaria típica de aproximadamente 1 mg/día de lo normal de fuentes alimentarias (Chun, Chung *et al.* 2007, Seelinger, Merfort *et al.* 2008, Jun, Shin *et al.* 2015, Kim, Park *et al.* 2015, Nabavi, Braidy *et al.* 2015). Luteolina se utiliza con frecuencia como un suplemento dietario con énfasis sobre sus beneficios antioxidantes (Sun, Sun *et al.* 2012), neurológicos (Xu, Wang *et al.* 2014) y antiinflamatorios (Seelinger, Merfort *et al.* 2008, Taliou, Zintzaras *et al.* 2013, Paredes-González, Fuentes *et al.* 2015).

[0064] Como un ejemplo de propiedades de PB125, cultivamos líneas de células que se habían transfectado establemente con constructos del gen de luciferasa accionado en su región promotora mediante copias de la secuencia de unión con ARE Nrf2, conocidos como constructos promotores-reporteros (Simmons, Fan *et al.* 2011, Shukla, Huang *et al.* 2012). Brevemente, las células establemente transfectadas de los tipos HepG2 (hígado humano), AREc32 (mama humana), MCF7 (mama humana), A549 (pulmón humano), 293T (riñón humano) y A172 (cerebro humano) se sembraron a baja densidad en placas de 24 cavidades y se incubaron a 37 °C con 10 % de CO₂. Después de 24 h, se añadieron varias concentraciones de PB125 a las células. Después de 18 h adicionales de incubación, las células se lisaron en sus cavidades con 100 µl de un tampón de lisis que contiene 3,5 mM de pirofosfato de sodio para estabilizar la salida de luz por la luciferasa. Se añadió una alícuota de 20 µl de lisado celular a un tubo de ensayo pequeño, se ubicó en un luminómetro BD Monolight 3010 para luminiscencia de fondo, y luego se inyectaron 50 µl de 1 mM de luciferina en el tubo. Se midieron unidades de luz relativas integradas durante 10 seg para cada muestra. Los tipos de célula de hígado, mama, cerebro y riñón ensayados exhibían activación génica de Nrf2 y expresión de luciferasa mediante tratamiento con combinaciones de series de PB100 con (Figura 10).

[0065] Como un ejemplo de los mecanismos de protección celular inducidos mediante tratamiento con PB125, examinamos la regulación génica hacia arriba en las células tratadas con PB125. Brevemente, las células hepáticas HepG2 cultivadas se trataron con PB125 a la concentración de 8 microgramos/ml durante 18 horas, luego se extrajo ARN total de las células HepG2 mediante el uso del RNeasy Total RNA Isolation Kit (QIAGEN Inc. Valencia, California, Estados Unidos de América). La concentración de cada muestra se determinó en base a la absorbancia a 260 nm (A₂₆₀). La pureza de cada muestra se determinó en base a la relación de A₂₆₀ a A₂₈₀. Un rango de 1,9-2,1 se consideró adecuadamente puro. La integridad de las muestras de ARN total se verificó por medio de Agilent 2200 Tape Station. El ARN total (250 ng) se convirtió en cADN bicatenario (ds-cADN) mediante el uso del kit de síntesis de cADN (Affymetrix). Se usó un cebador oligo-dT que contenía el promotor

de T7 ARN polimerasa. El ds-cADN luego se purificó y se recuperó mediante el uso de perlas de purificación (Affymetrix). A continuación, se llevó a cabo una transcripción *in vitro* para generar cARN rotulado con biotina mediante el uso de un RNA Transcript Labeling Kit (Affymetrix). El cARN rotulado con biotina se purificó mediante el uso de una columna por afinidad RNeasy (Qiagen). Para asegurar una hibridación óptima en la disposición de oligonucleótidos, se fragmentó el cARN. La fragmentación se llevó a cabo de modo tal que los fragmentos de cARN estén entre 50-200 bases de largo por incubación de cARN a 94 °C durante 35 min en un tampón de fragmentación. La muestra luego se añadió a una solución de hibridación con contenido de 100 mM de MES, 1 M de Na⁺ y 20 mM de EDTA en presencia del 0,01 % de Tween 20. La concentración final del cARN fragmentado era de 0,05 µg/µL. La hibridación se llevó a cabo mediante la incubación de 200 µL de la muestra en la disposición de expresión génica humana Affymetrix GeneChip® PrimeView™ (Affymetrix Inc., Santa Clara, California, Estados Unidos de América) a 45 °C durante 16 horas mediante el uso de un GeneChip® Hybridization Oven 640 (Affymetrix). Después de la hibridación, las soluciones de hibridación se retiraron y las disposiciones se lavaron y se tiñeron con estreptavidina-ficoeritrina mediante el uso de una GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix). Las disposiciones se leyeron a una resolución de 2,5 a 3 micrones mediante el uso del GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). Cada gen estaba representado por el uso de ~11 sondas por transcripto y muchas sondas de control. El programa de software Command Console GeneChip se usó para determinar la intensidad de expresión para todos los genes en la disposición. Para este experimento, la cantidad de veces de inducción de genes mediante tratamiento con PB125 de células HepG2 se calculó en comparación con la intensidad promedio observada en células de control HepG2 en solución de cultivo sin estímulo adicional como PB125. Como se representa en la Tabla 1, los genes regulados hacia arriba por PB125 incluían una variedad de genes antioxidantes regulados por Nrf2, antiinflamatorios, de respuesta al estrés celular y otros genes protectores. Estos genes incluyen, por ejemplo, genes implicados en la producción y la regeneración de GSH, el secuestro de hierro, la utilización de GSH, la producción, regeneración y utilización de tioredoxina (TXN), etc. La Tabla 1 enumera genes de ejemplo relevantes que se regulan hacia arriba por PB125. En síntesis, este ejemplo sostiene que el mecanismo de protección celular por PB125 implica la activación de la vía de señalización celular de Nrf2.

Tabla 1. El análisis de microarray génico reveló que PB125 regula numerosos genes asociados con Nrf2 y genes asociados con efectos antioxidantes, antiinflamatorios y otros efectos protectores celulares.

ID del grupo de sondas	HepG2 (Control)	Cantidad de veces de inducción por BP125	ID pública representativa	Título del gen	Símbolo del gen
11715650_a_at	45,53	10,10	AF208018.1	tiorredoxina reductasa 1	TXNRD1
11756634_a_at	414,69	2,81	CR597200.1	glutación reductasa	GSR
11750770_a_at	1005,93	2,37	AK304288.1	glutamato-cisteína ligada, subunidad catalítica	GCLC
11759710_at	199,19	2,04	BC024223.2	dominio de tiorredoxina que contiene 9	TXNDC9
11744680_a_at	231,18	7,72	AB040875.1	familia portadora de soluto 7 (cadena liviana del transportador de aminoácidos aniónicos, sistema xc), miembro 11	SLC7A11
11756634_a_at	414,69	2,81	CR597200.1	glutación reductasa	GSR
11716939_a_at	1217,99	8,63	NM_002133.1	hemo oxigenasa (deciclada) 1	HMOX1
11725496_a_at	488,83	8,87	NM_032717.3	1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa 9	AGPAT9
11752577_at	771,67	3,62	AY258285.1	ferritina, polipéptido pesado 1	FTH1
11715649_s_at	3236,76	4,73	NM_003330.2	tiorredoxina reductasa 1	TXNRD1
11716950_s_at	1908,04	5,45	NM_080725.1	sulfirredoxina 1	SRXN1
11752843_x_at	1202,52	4,54	AK304877.1	secuestrosoma 1	SQSTM1
11750416_a_at	69,07	9,41	AK293322.1	tiorredoxina reductasa 1	TXNRD1

ID del grupo de sondas	HepG2 (Control)	Cantidad de veces de inducción por BP125	ID pública representativa	Título del gen	Símbolo del gen
11756585_a_at	86,47	6,47	CR614710.1	acuaporina 3 (grupo sanguíneo de Gill)	AQP3
11735676_a_at	231,82	3,98	NM_182980.2	inhibidor del crecimiento 1 inducido por estrés oxidativo	OSGIN1
11753445_a_at	244,58	10,37	BT019785.1	hemo oxigenasa (deciclada) 1	HMOX1
11723490_at	1195,87	6,07	BC041809.1	glutamato-cisteína ligada, subunidad modificadora	GCLM
11756915_a_at	63,77	8,33	AL833940.1	citocromo P450, familia 4, subfamilia F, polipéptido 11	CYP4F11
11736655_a_at	499,98	7,20	NM_012212.3	prostaglandina reductasa 1	PTGR1
11719171_a_at	2722,97	6,99	NM_001353.5	aldo-ceto reductasa familia 1, miembro C1 (dihidrodiol deshidrogenasa 1; 20-alfa (3-alfa)-hidroxiesteroide deshidrogenasa)	AKR1C1
11742378_a_at	1112,08	4,32	NM_001080538.1	aldo-ceto reductasa familia 1, miembro B10 (aldosa reductasa) /// aldo-ceto reductasa familia 1, miembro B15	AKR1B10 /// AKR1B15
11729101_a_at	2435,26	6,95	NM_205845.1	aldo-ceto reductasa familia 1, miembro C2 (dihidrodiol deshidrogenasa 2;	AKR1C2 /// LOC100653286

ID del grupo de sondas	HepG2 (Control)	Cantidad de veces de inducción por BP125	ID pública representativa	Título del gen	Símbolo del gen
				proteína de unión de ácido biliar; 3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo III) /// aldo-ceto reductasa familia 1 miembro tipo C2	
11757882_x_at	59,22	2,02	BU784580	glutación S-transferasa alfa 1/// glutación S-transferasa alfa 2	GSTA1 /// GSTA2

[0066] Como un ejemplo de los mecanismos antiinflamatorios inducidos por el tratamiento de PB125, examinamos los niveles de citoquina en células primarias tratadas con PB125 y estimuladas con endotoxina de lipopolisacárido bacteriana (LPS). Los macrófagos peritoneales del ratón se obtuvieron después del tratamiento con tioglicolato en la cavidad peritoneal durante 1 semana seguido por recuperación con lavado de aproximadamente 7 millones de macrófagos. Las alícuotas de células se plaquearon y se trataron con control de etanol (0,1 % para lograr PB125) o PB125 (5 ug/mL) durante 16 h, luego se estimularon con lipopolisacárido (100 ng/mL) o vehículo (control negativo) durante 5 h. El ARN total se aisló de las células para el análisis de PCR cuantitativo para medir el TNF α (factor-alfa de necrosis tumoral) y la expresión génica de IL-1 β (interleuquina-1 beta), normalizada a niveles 18s. Notablemente, el tratamiento con PB125 causó una reducción dramática en la expresión inducida por LPS de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1 β . Véase la Figura 11.

[0067] Una combinación de romero (6,7 % de carnosol), ashwagandha (1 % de witaferina A) y luteolina (98 % de luteolina) de PB125 (a 30:10:4 de romero:ashwagandha:luteolina) incrementó la mayor expresión génica dependiente de Nrf2 del gen GCLM en muestras de células bucales de un sujeto humano que toma 60 mg de PB125 por día p.o., en comparación con las muestras de células bucales de dos sujetos de control normales (ensayados por RT-PCR cuantitativa en ARN purificado, usando cebadores específicos de GCLM humanos (cebador directo:

TTGCCTCCTGCTGTGTGATG (SEQ ID NO. 1), cebador inverso: GTGCGCTTGAATGTCAGGAA) (SEQ ID NO. 2), normalizado a GAPDH, con cantidad de veces de cambio relativo calculado por el método $2^{(\Delta\Delta Ct)}$. Véase la Figura 13.

[0068] Como datos adicionales que sustentan la invención, hallamos sorprendentes cantidades de sinergia entre los ingredientes de romero, jengibre, ashwagandha y luteolina. Por ejemplo, bajas concentraciones de luteolina se sinergizaron con combinaciones de extractos de romero y extractos de jengibre para activar Nrf2. En la presente invención, se pueden añadir otros agentes a las combinaciones activantes de Nrf2 siempre que no interfieran con la funcionalidad activante de Nrf2. Hallamos que los ingredientes de silimarina y bacósidos no antagonizaban la activación de Nrf2 de los ingredientes de romero, jengibre, ashwagandha y luteolina.

[0069] Siguiendo con este experimento de otra forma, la luciferasa RLU medida 17, 24, 41 y 48 horas después del tratamiento de las células HepG2 en donde el tratamiento con PB125 en los rangos de 0-10 ug/mL y 0-50 ug/mL se lavó después de 2 horas de tiempo de exposición y se reemplazó por medio de cultivo celular fresco mostró que la producción de luciferasa accionada por Nrf2 era máxima a las 17 h, luego rápidamente disminuyó a aproximadamente niveles de línea base a las 48 horas de tratamiento.

[0070] La repetición de tratamientos en células cultivadas de HepG2 con exposiciones de 2 horas cada 24 horas, luego la lectura 24 horas más tarde, mostraron que la activación de Nrf2 por PB125 desapareció entre las 24 y 48 horas y las células aún se podían activar otra vez si se volvían a tratar con PB125.

[0071] Como un ejemplo de los mecanismos antiinflamatorios inducidos mediante tratamiento con PB123 o PB125, examinamos la expresión génica y los niveles de citoquinas en las células endoteliales de las arterias pulmonares primarias humanas (HPAEC) tratadas con PB123 o PB125 y estimuladas con endotoxina de lipopolisacárido bacteriano (LPS). La estimulación con LPS indujo la expresión de genes relacionados con la inflamación, y esta regulación hacia arriba se atenuó con el tratamiento con PB123 o PB125. La Tabla 2 muestra los 40 genes más regulados hacia arriba mediante tratamiento con LPS, y muestra que tanto el tratamiento con PB123 como con PB125 atenuaban la expresión génica inducida por LPS. La estimulación con LPS aumentó la liberación de la proteína interleuquina-6 proinflamatoria (IL6) de las células HPAEC y este incremento fue atenuado con el tratamiento con PB125. Véase la Figura 12.

Tabla 2. El análisis de microarray técnico reveló que PB123 y PB125 exhibían efectos antiinflamatorios. Tanto PB123 como PB125 redujeron las señales de expresión inducidas por LPS de los 40 genes que eran los más regulados hacia arriba por LPS.

Símbolo del gen	Control	LPS	LPS+ PB123	LPS+ PB125	Título del gen	Símbolo del gen	LPS/LPS +PB123	LPS/LPS +PB125
CXCL3	33	1441	492	225	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 3	CXCL3	2,9	6,4
CCL20	196	4776	2055	1034	quimioquina (motivo C-C) ligando 20	CCL20	2,3	4,6
CXCL2	292	5407	2956	2669	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 2	CXCL2	1,8	2,0
CSF2	41	621	132	133	factor estimulante de colonias 2 (granulocitos-macrófagos)	CSF2	4,7	4,7
TNFAIP6	33	390	91	60	factor de necrosis tumoral, proteína alfa-inducida 6	TNFAIP6	4,3	6,5
IL8	590	6750	5571	4257	interleuquina 8	IL8	1,2	1,6
TNFAIP2	285	3089	798	512	factor de necrosis tumoral, proteína alfa-inducida 2	TNFAIP2	3,9	6,0
CXCL10	67	668	47	31	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 10	CXCL10	14,3	21,3
CXCL1	1195	11398	7858	7819	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 1 (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa)	CXCL1	1,5	1,5
CX3CL1	386	3618	444	288	quimioquina (motivo C-X3-C) ligando 1	CX3CL1	8,2	12,5
BIRC3	86	798	349	190	repetición de IAP baculoviral que contiene 3	BIRC3	2,3	4,2
CD69	36	333	111	45	molécula CD69	CD69	3,0	7,3
TNFAIP	94	814	309	190	factor de necrosis	TNFAIP	2,6	4,3

Símbolo del gen	Control	LPS	LPS+ PB123	LPS+ PB125	Título del gen	Símbolo del gen	LPS/LPS +PB123	LPS/LPS +PB125
3					tumoral, proteína alfa-inducida 3	3		
SELE	1465	12429	5605	2612	selectina E	SELE	2,2	4,8
CXCL6	246	1683	458	178	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2)	CXCL6	3,7	9,5
NKX3-1	60	398	141	125	NK3 homeobox 1	NKX3-1	2,8	3,2
CSF3	92	592	272	290	factor estimulante de colonias 3 (granulocitos)	CSF3	2,2	2,0
RND1	98	601	224	236	familia Rho GTPasa 1	RND1	2,7	2,5
LTB	244	1478	374	314	linfotoxina beta (superfamilia de TNF, miembro 3)	LTB	3,9	4,7
FAM101A /// ZNF664	63	329	70	78	familia con similitud de secuencia 101, miembro A /// proteína FAM101A	FAM101A /// ZNF664	4,7	4,2
CXCL5	163	844	127	63	quimioquina (motivo C-X-C) ligando 5	CXCL5	6,7	13,3
CEBPD	183	947	493	489	proteína de unión CCAAT/potenciador (C/EBP), delta	CEBPD	1,9	1,9
MAP3K8	26	128	75	45	proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno 8	MAP3K8	1,7	2,9
TRAF1	158	730	421	328	factor asociado con receptor de TNF 1	TRAF1	1,7	2,2
IL6	429	1967	1166	1105	interleuquina 6 (interferón, beta 2)	IL6	1,7	1,8
VCAM1	1315	5963	2065	1116	molécula de adhesión celular vascular 1	VCAM1	2,9	5,3
ICAM1	288	1290	543	416	molécula de adhesión intercelular 1	ICAM1	2,4	3,1
SLC7A2	356	1592	660	383	familia de portadores de	SLC7A2	2,4	4,2

Símbolo del gen	Control	LPS	LPS+ PB123	LPS+ PB125	Título del gen	Símbolo del gen	LPS/LPS +PB123	LPS/LPS +PB125
					solutos 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+), miembro 2			
CXCR7	291	1286	660	521	quimioquina (motivo C-X-C) receptor 7	CXCR7	1,9	2,5
NCOA7	132	561	212	137	coactivador de receptor nuclear 7	NCOA7	2,6	4,1
IRF1	240	1014	579	489	factor de regulación de interferón 1	IRF1	1,8	2,1
BCL2A1	31	130	39	18	proteína relacionada con BCL2 A1	BCL2A1	3,3	7,0
TNFRSF9	32	124	33	30	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 9	TNFRSF9	3,7	4,1
IL1A	236	888	589	561	interleuquina 1, alfa	IL1A	1,5	1,6
MT1G	36	134	116	163	metalotioneína 1G	MT1G	1,2	0,8
TIFA	81	293	175	147	proteína interactuante con TRAF con dominio asociado con tenedor (forkhead)	TIFA	1,7	2,0
CCL5	95	330	95	83	quimioquina (motivo C-C) ligando 5	CCL5	3,5	4,0
CAB39	26	91	48	43	proteína de unión con calcio 39	CAB39	1,9	2,1
SOCS1	29	95	73	76	supresor de señalización de citoquinas 1	SOCS1	1,3	1,2
IL1B	52	170	58	66	interleuquina 1, beta	IL1B	2,9	2,6

Ejemplo 2 PB125

[0072]Una forma de realización de la presente descripción es una combinación de extracto de romero (especificado al 5 al 50 % de carnosol), extracto de ashwagandha (especificado al 0,5-10 % de witaferina A) y luteolina (especificada al

10-100 % de luteolina), en las relaciones de masa de 30:10:6, 30:10:5, 30:10:4 o 30:10:1 con una dosis humana diaria de la combinación que va de 42 a 1050 mg como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición con especificaciones para los ingredientes y los rangos de dosis diarias de PB125 para seres humanos

Ingrediente:	Romero	Ashwagandha	Luteolina
Rango espec.:	5-50 % de carnosol o 10-100 % diterpenos	0,5-10 % de witaferina A	10-100 % de luteolina
Rango espec. preferido:	5-10 % de carnosol	1-3 % de witaferina A	95-99 % de luteolina
Rango de dosis diario:	30-750 mg	10-250 mg	2-50 mg
Rango de composición:	30-90 %	10-30 %	2-8 %
Relación de masa preferida	30	10	6
Relación de masa preferida	30	10	5
Relación de masa preferida	30	10	4
Relación de masa preferida	30	10	1

Ejemplo 3 PB127

[0073]Otra forma de realización de la presente descripción es una combinación de PB127 de extracto de romero (especificado al 5 a 10 % de carnosol), extracto de jengibre (especificado al 1-10 % de 6-shogaol y/o 10-25 % de 6-gingerol), luteolina (especificada al 90-100 % de luteolina) y extracto de cardo lechero (especificado al 50-90 % de silimarina), en la relación en masa de 10:5:1:30, respectivamente, con una dosis humana diaria de la combinación que va de 46 a 920 mg como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición con especificaciones para los ingredientes y los rangos de dosis diarias de PB127 para seres humanos

Ingrediente:	Romero	Jengibre	Luteolina	Cardo lechero
Rango espec.:	5-50 % de carnosol o 10- 100 % de diterpenos	0,5-20 % de 6- shogaol o 6-gingerol	10-100 % de luteolina	10-100 % de silimarina
Rango espec. preferido:	5-10 % de carnosol	10-20 % de 6- shogaol	95-99 % de luteolina	75-100 % de silimarina
Rango de dosis diaria:	10-200 mg	5-100 mg	1-20 mg	30-600 mg
Rango de composición:	10-30 %	5-15 %	1-3 %	25-75 %
Relación de masa preferida	10	5	1	30

Ejemplo 4 PB129

[0074] Otra forma de realización de la presente descripción es una combinación de PB129 de extracto de romero (especificado al 5 a 10 % de carnosol), extracto de jengibre (especificado al 1-10 % de 6-shogaol y/o 10-25 % de 6-gingerol), luteolina (especificada al 90-100 % de luteolina), extracto de cardo lechero (especificado al 50-90 % de silimarina) y extracto de Bacopa monnieri (especificado al 10-60 % de bacósidos) en la relación en masa de 10:5:1:30:48, respectivamente, con una dosis humana diaria de la combinación que va de 94 a 1820 mg como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición con especificaciones para los ingredientes y los rangos de dosis diarias de PB129 para seres humanos

Ingrediente:	Romero	Jengibre	Luteolina	Cardo lechero	Bacopa
Rango espec.:	5-50 % de carnosol o 10-100% de diterpenos	0,5-20 % de 6- shogaol o 6-gingerol	10-100 % de luteolina	10-100 % de silimarina	10-80 % de bacósidos

Rango espec. preferido:	5-10 % de carnosol	10-20 % de 6-shogaol	95-99 % de luteolina	75-100 % de silimarina	20-60 % de bacósidos
Rango de dosis diaria:	10-200 mg	5-100 mg	1-20 mg	30-600 mg	48-900 mg
Rango de composición:	5-15 %	2,5-7,5 %	0,5-1,5 %	12,5-37,5 %	25-75 %
Relación de masa preferida	10	5	1	30	48

Ejemplo 5 PB123

[0075] Otra forma de realización de la presente descripción es una combinación de PB123 de extracto de romero (especificado al 5 a 10 % de carnosol), extracto de jengibre (especificado al 1-10 % de 6-shogaol y/o 10-25 % de 6-gingerol), luteolina (especificada al 90-100 % de luteolina) en la relación en masa de 10:5:1, respectivamente, con una dosis humana diaria de la combinación que va de 16 a 320 mg como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición con especificaciones para los ingredientes y los rangos de dosis diarias de PB123 para seres humanos

Ingrediente:	Romero	Jengibre	Luteolina
Rango espec.:	5-50 % de carnosol o 10-100 % de diterpenos	0,5-20 % de 6-shogaol o 6-gingerol	10-100 % de luteolina
Rango espec. preferido:	5-10 % de carnosol	10-20 % de 6-shogaol	95-99 % de luteolina
Rango de dosis diaria:	10-200 mg	5-100 mg	1-20 mg
Rango de composición:	10-30 %	5-15 %	1-3 %
Relación de masa preferida	10	5	1

Ejemplo 6 PB131

[0076] Otra forma de realización de la presente invención es una combinación de PB131 de extracto de romero (especificado al 5 a 10 % de carnosol), extracto de jengibre (especificado al 1-10 % de 6-shogaol y/o 10-25 % de 6-gingerol), luteolina (especificada al 90-100 % de luteolina) y extracto de Bacopa monnieri (especificado

al 10-60 % de bacósidos) en la relación en masa de 10:5:1:48, respectivamente, con una dosis humana diaria de la combinación que va de 64 a 1220 mg como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición con especificaciones para los ingredientes y los rangos de dosis diarias de PB131 para seres humanos

Ingrediente:	Romero	Jengibre	Luteolina	Bacopa
Rango espec.:	5-50 % de carnosol o 10-100 % de diterpenos	0,5-20 % de 6-shogaol o 6-gingerol	10-100 % de luteolina	10-80 % de bacósidos
Rango espec. preferido:	5-10 % de carnosol	10-20 % de 6-shogaol	95-99 % de luteolina	20-60 % de bacósidos
Rango de dosis diaria:	10-200 mg	5-100 mg	1-20 mg	48-900 mg
Rango de composición:	5-15 %	2,5-7,5 %	0,5-1,5 %	25-75 %
Relación de masa preferida	10	5	1	48

[0077] Los contenidos de todas las referencias citadas (incluyendo las referencias de literatura, patentes, solicitudes de patentes y sitios web) que se pueden citar a lo largo de esta solicitud o que se enumeran más abajo están expresamente incorporadas por referencia en su totalidad para cualquier finalidad en la presente descripción. La revelación puede emplear, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de microbiología, biología molecular y biología celular, que se conocen bien en la técnica.

[0078] Los métodos y sistemas revelados se pueden modificar sin apartarse de su espíritu. Se ha de observar que el asunto contenido en la descripción anterior o que se muestra en los dibujos que acompañan se han de interpretar como ilustrativos y no en un sentido limitante.

[0079] Las siguientes referencias, patentes y publicación de solicitudes de patentes se citan en esta descripción o son relevantes para la presente divulgación. Todos los documentos enumerados a continuación, junto con otros documentos, patentes y publicación de solicitudes de patentes citadas a lo largo de estas divulgaciones, se incorporan aquí como referencia, como si el contenido completo se reprodujera en este documento.

Aggarwal, B. B., Y. Takada and O. V. Oommen (2004). "From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals." *Expert Opin Investig Drugs* 13(10): 1327-1338.

Anadon, A., M. R. Martinez-Larranaga, M. A. Martinez, I. Ares, M. R. Garcia-Risco, F. J. Senorans and G. Reglero (2008). "Acute oral safety study of rosemary extracts in rats." *J Food Prot* 71(4): 790-795.

Baitharu, I., V. Jain, S. N. Deep, S. Shroff, J. K. Sahu, P. K. Naik and G. Ilavazhagan (2014). "Withanolide A prevents neurodegeneration by modulating hippocampal glutathione biosynthesis during hypoxia." *PLoS One* 9(10): e105311.

Bjelakovic, G., D. Nikolova, L. L. Gluud, R. G. Simonetti and C. Gluud (2007). "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis." *JAMA* 297(8): 842-857.

Bocci, V. and G. Valacchi (2015). "Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments." *Front Chem* 3: 4.

Boon, H. and J. Wong (2004). "Botanical medicine and cancer: a review of the safety and efficacy." *Expert Opin Pharmacother* 5(12): 2485-2501.

Boutten, A., D. Goven, J. Boczkowski and M. Bonay (2010). "Oxidative stress targets in pulmonary emphysema: focus on the Nrf2 pathway." *Expert Opin Ther Targets* 14(3): 329-346.

Bozin, B., N. Mimica-Dukic, I. Samojlik and E. Jovin (2007). "Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils." *J Agric Food Chem* 55(19): 7879-7885.

- Chandrasekhar, K., J. Kapoor and S. Anishetty (2012). "A prospective, randomized double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy of a high-concentration full-spectrum extract of ashwagandha root in reducing stress and anxiety in adults." *Indian J Psychol Med* 34(3): 255-262.
- Cho, H. Y. and S. R. Kleeberger (2010). "Nrf2 protects against airway disorders." *Toxicol Appl Pharmacol* 244(1): 43-56.
- Chun, O. K., S. J. Chung and W. O. Song (2007). "Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults." *J Nutr* 137(5): 1244-1252.
- Del Campo, J., M. J. Amiot and C. Nguyen-The (2000). "Antimicrobial effect of rosemary extracts." *J Food Prot* 63(10): 1359-1368.
- Eggler, A. L., K. A. Gay and A. D. Mesecar (2008). "Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2." *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1: S84-94.
- Emami, F., H. Ali-Beig, S. Farahbakhsh, N. Mojabi, B. Rastegar-Moghadam, S. Arbabian, M. Kazemi, E. Tekieh, L. Golmanesh, M. Ranjbaran, C. Jalili, A. Noroozzadeh and H. Sahraei (2013). "Hydroalcoholic extract of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its constituent carnosol inhibit formalin-induced pain and inflammation in mice." *Pak J Biol Sci* 16(7): 309-316.
- Gonzalez-Vallinas, M., G. Reglero and A. Ramirez de Molina (2015). "Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract as a Potential Complementary Agent in Anticancer Therapy." *Nutr Cancer*: 1-9.
- Heistad, D. D., Y. Wakisaka, J. Miller, Y. Chu and R. Pena-Silva (2009). "Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases." *Circ J* 73(2): 201-207.
- Huang, Y., W. Li, Z.-y. Su and A.-N. T. Kong (2015). "The complexity of the Nrf2 pathway: Beyond the antioxidant response." *The Journal of Nutritional Biochemistry*: in press.
- Hybertson, B. M. and B. Gao (2014). "Role of the Nrf2 signaling system in health and disease." *Clin Genet* 86(5): 447-452.
- Jacobs, B. P., C. Dennehy, G. Ramirez, J. Sapp and V. A. Lawrence (2002). "Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis." *Am J Med* 113(6): 506-515.

- Johnson, D. A. and J. A. Johnson (2015). "Nrf2-a therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases." *Free Radic Biol Med*.
- Johnson, J. J. (2011). "Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent." *Cancer letters* 305(1): 1-7.
- Jun, S., S. Shin and H. Joung (2015). "Estimation of dietary flavonoid intake and major food sources of Korean adults." *Br J Nutr*: 1-10.
- Kaufman, A. C., S. V. Salazar, L. T. Haas, J. Yang, M. A. Kostylev, A. T. Jeng, S. A. Robinson, E. C. Gunther, C. H. van Dyck, H. B. Nygaard and S. M. Strittmatter (2015). "Fyn inhibition rescues established memory and synapse loss in Alzheimer mice." *Ann Neurol* 77(6): 953-971.
- Kensler, T. W., N. Wakabayashi, S. L. Slocum, J. J. Skoko and S. Shin (2010). "When Nrf2 Talks, Who's Listening?" *Antioxid Redox Signal*.
- Khan, M. A., M. Subramanayan, V. K. Arora, B. D. Banerjee and R. S. Ahmed (2015). "Effect of *Withania somnifera* (Ashwagandha) root extract on amelioration of oxidative stress and autoantibodies production in collagen-induced arthritic rats." *J Complement Integr Med* 12(2): 117-125.
- Kim, Y. J., M. Y. Park, N. Chang and O. Kwon (2015). "Intake and major sources of dietary flavonoid in Korean adults: Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2010-2012." *Asia Pac J Clin Nutr* 24(3): 456-463.
- Klancnik, A., B. Guzej, M. H. Kolar, H. Abramovic and S. S. Mozina (2009). "In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations." *J Food Prot* 72(8): 1744-1752.
- Koehn, F. E. (2006). "Therapeutic potential of natural product signal transduction agents." *Curr Opin Biotechnol* 17(6): 631-637.
- Koehn, F. E. and G. T. Carter (2005). "The evolving role of natural products in drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* 4(3): 206-220.
- Kumar, G., A. Srivastava, S. K. Sharma, T. D. Rao and Y. K. Gupta (2015). "Efficacy & safety evaluation of Ayurvedic treatment (Ashwagandha powder & Sidh Makardhwaj) in rheumatoid arthritis patients: a pilot prospective study." *Indian J Med Res* 141(1): 100-106.

- Kyung-Soo, C., K. Juthika, C. In Gyeong and K. and Joydeb Kumar (2014). "Carnosol: A Phenolic Diterpene With Cancer Chemopreventive Potential." *Journal of Cancer Prevention* 19(2): 103-110.
- Lakhan, S. E., C. T. Ford and D. Tepper (2015). "Zingiberaceae extracts for pain: a systematic review and meta-analysis." *Nutr J* 14: 50.
- Lee, K. H. (2010). "Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach." *J Nat Prod* 73(3): 500-516.
- Maher, J. and M. Yamamoto (2010). "The rise of antioxidant signaling--the evolution and hormetic actions of Nrf2." *Toxicol Appl Pharmacol* 244(1): 4-15.
- Martin, D., A. I. Rojo, M. Salinas, R. Diaz, G. Gallardo, J. Alam, C. M. R. de Galarreta and A. Cuadrado (2004). "Regulation of Heme Oxygenase-1 Expression through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway and the Nrf2 Transcription Factor in Response to the Antioxidant Phytochemical Carnosol." *Journal of Biological Chemistry* 279(10): 8919-8929.
- Mishra, L. C., B. B. Singh and S. Dagenais (2000). "Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review." *Altern Med Rev* 5(4): 334-346.
- Moon, E. J. and A. Giaccia (2015). "Dual roles of NRF2 in tumor prevention and progression: possible implications in cancer treatment." *Free Radic Biol Med* 79: 292-299.
- Nabavi, S. F., N. Braidy, O. Gortzi, E. Sobarzo-Sanchez, M. Daglia, K. Skalicka-Woźniak and S. M. Nabavi (2015). "Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review." *Brain Research Bulletin* 119, Part A: 1-11.
- Ortuno, J., R. Serrano and S. Banon (2015). "Antioxidant and antimicrobial effects of dietary supplementation with rosemary diterpenes (carnosic acid and carnosol) vs vitamin E on lamb meat packed under protective atmosphere." *Meat Sci* 110: 62-69.
- Paredes-Gonzalez, X., F. Fuentes, S. Jeffery, C. L. Saw, L. Shu, Z. Y. Su and A. T. Kong (2015). "Induction of NRF2-mediated gene expression by dietary phytochemical flavones apigenin and luteolin." *Biopharm Drug Dispos*.

- Pechanova, O. and F. Simko (2009). "Chronic antioxidant therapy fails to ameliorate hypertension: potential mechanisms behind." *J Hypertens* 27 Suppl 6: S32-36.
- Petiwala, S. M. and J. J. Johnson (2015). "Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity." *Cancer Lett* 367(2): 93-102.
- Priyandoko, D., T. Ishii, S. C. Kaul and R. Wadhwa (2011). "Ashwagandha leaf derived withanone protects normal human cells against the toxicity of methoxyacetic acid, a major industrial metabolite." *PLoS One* 6(5): e19552.
- Raghavan, A. and Z. A. Shah (2015). "Withania somnifera: a pre-clinical study on neuroregenerative therapy for stroke." *Neural Regen Res* 10(2): 183-185.
- Rai, M., P. S. Jogee, G. Agarkar and C. A. Santos (2016). "Anticancer activities of *Withania somnifera*: Current research, formulations, and future perspectives." *Pharm Biol* 54(2): 189-197.
- Raskovic, A., I. Milanovic, N. Pavlovic, T. Cebovic, S. Vukmirovic and M. Mikov (2014). "Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential." *BMC Complement Altern Med* 14: 225.
- Roodenrys, S., D. Booth, S. Bulzomi, A. Phipps, C. Micallef and J. Smoker (2002). "Chronic effects of Brahmi (*Bacopa monnieri*) on human memory." *Neuropsychopharmacology* 27(2): 279-281.
- Saller, R., R. Meier and R. Brignoli (2001). "The use of silymarin in the treatment of liver diseases." *Drugs* 61(14): 2035-2063.
- Saremi, A. and R. Arora (2009). "Vitamin E and Cardiovascular Disease." *Am J Ther.*
- Satoh, H., T. Moriguchi, K. Taguchi, J. Takai, J. M. Maher, T. Suzuki, P. T. Winnard, Jr., V. Raman, M. Ebina, T. Nukiwa and M. Yamamoto (2010). "Nrf2-deficiency creates a responsive microenvironment for metastasis to the lung." *Carcinogenesis* 31(10): 1833-1843.
- Satoh, T., K. Kosaka, K. Itoh, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Y. Shimojo, C. Kitajima, J. Cui, J. Kamins, S. Okamoto, M. Izumi, T. Shirasawa and S. A. Lipton (2008). "Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1." *J Neurochem* 104(4): 1116-1131.

- Seelinger, G., I. Merfort and C. M. Schempp (2008). "Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin." *Planta Med* 74(14): 1667-1677.
- Sekhar, K. R. and M. L. Freeman (2015). "NRF2 promotes survival following exposure to ionizing radiation." *Free Radic Biol Med*.
- Shukla, S. J., R. Huang, S. O. Simmons, R. R. Tice, K. L. Witt, D. Vanleer, R. Ramabhadran, C. P. Austin and M. Xia (2012). "Profiling environmental chemicals for activity in the antioxidant response element signaling pathway using a high throughput screening approach." *Environ Health Perspect* 120(8): 1150-1156.
- Simmons, S. O., C. Y. Fan, K. Yeoman, J. Wakefield and R. Ramabhadran (2011). "NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent." *Curr Chem Genomics* 5: 1-12.
- Sun, G. B., X. Sun, M. Wang, J. X. Ye, J. Y. Si, H. B. Xu, X. B. Meng, M. Qin, J. Sun, H. W. Wang and X. B. Sun (2012). "Oxidative stress suppression by luteolin-induced heme oxygenase-1 expression." *Toxicol Appl Pharmacol* 265(2): 229-240.
- Suzuki, T. and M. Yamamoto (2015). "Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system." *Free Radic Biol Med*.
- Taliou, A., E. Zintzaras, L. Lykouras and K. Francis (2013). "An open-label pilot study of a formulation containing the anti-inflammatory flavonoid luteolin and its effects on behavior in children with autism spectrum disorders." *Clin Ther* 35(5): 592-602.
- Theoharides, T. C., S. Asadi and S. Panagiotidou (2012). "A case series of a luteolin formulation (NeuroProtek(R)) in children with autism spectrum disorders." *Int J Immunopathol Pharmacol* 25(2): 317-323.
- Vaishnavi, K., N. Saxena, N. Shah, R. Singh, K. Manjunath, M. Uthayakumar, S. P. Kanaujia, S. C. Kaul, K. Sekar and R. Wadhwa (2012). "Differential activities of the two closely related withanolides, Withaferin A and Withanone: bioinformatics and experimental evidences." *PLoS One* 7(9): e44419.
- Velmurugan, K., J. Alam, J. M. McCord and S. Pugazhenthii (2009). "Synergistic induction of heme oxygenase-1 by the components of the antioxidant supplement Protandim." *Free Radic Biol Med* 46(3): 430-440.

- Wang, S., C. Zhang, G. Yang and Y. Yang (2014). "Biological properties of 6-gingerol: a brief review." *Nat Prod Commun* 9(7): 1027-1030.
- Wankhede, S., D. Langade, K. Joshi, S. R. Sinha and S. Bhattacharyya (2015). "Examining the effect of *Withania somnifera* supplementation on muscle strength and recovery: a randomized controlled trial." *J Int Soc Sports Nutr* 12: 43.
- Wen, Z., Z. Wang, S. Wang, R. Ravula, L. Yang, J. Xu, C. Wang, Z. Zuo, M. S. Chow, L. Shi and Y. Huang (2011). "Discovery of molecular mechanisms of traditional Chinese medicinal formula Si-Wu-Tang using gene expression microarray and connectivity map." *PLoS One* 6(3): e18278.
- Wilson, P. B. (2015). "Ginger (*Zingiber officinale*) as an Analgesic and Ergogenic Aid in Sport: A Systemic Review." *J Strength Cond Res* 29(10): 2980-2995.
- Wu, P. S., J. H. Yen, M. C. Kou and M. J. Wu (2015). "Luteolin and Apigenin Attenuate 4-Hydroxy-2-Nonenal-Mediated Cell Death through Modulation of UPR, Nrf2-ARE and MAPK Pathways in PC12 Cells." *PLoS One* 10(6): e0130599.
- Xiang, Q., Z. Liu, Y. Wang, H. Xiao, W. Wu, C. Xiao and X. Liu (2013). "Carnosic acid attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury in rats via fortifying cellular antioxidant defense system." *Food and Chemical Toxicology* 53(0): 1-9.
- Xu, J., H. Wang, K. Ding, L. Zhang, C. Wang, T. Li, W. Wei and X. Lu (2014). "Luteolin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE pathway." *Free Radic Biol Med* 71: 186-195.
- Zhang, Y. C., F. F. Gan, S. B. Shelar, K. Y. Ng and E. H. Chew (2013). "Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in *Ixeris sonchifolia* Hance, provide neuroprotective effects against ischemia-induced cellular injury." *Food Chem Toxicol* 59: 272-280.
- Zick, S. M., Z. Djuric, M. T. Ruffin, A. J. Litzinger, D. P. Normolle, S. Alrawi, M. R. Feng and D. E. Brenner (2008). "Pharmacokinetics of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(8): 1930-1936.