

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 084**

51 Int. Cl.:

A61K 36/81 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2019** **PCT/JP2019/027870**
87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2020** **WO20017489**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2019** **E 19838332 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024** **EP 3824899**

54 Título: **Inhibidor de la producción de citoquinas inflamatorias**

30 Prioridad:

17.07.2018 JP 2018133954

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2024

73 Titular/es:

SAISEI PHARMA CO., LTD. (100.0%)
34-8 Okubo-cho 3-chome
Moriguchi-shi, Osaka 570-0012, JP

72 Inventor/es:

INUI, TOSHIO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 984 084 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidor de la producción de citoquinas inflamatorias

Campo técnico

5 La presente invención se relaciona con inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias que contienen un extracto de tomate como ingrediente activo.

Antecedentes de la técnica

10 Las citoquinas inflamatorias son sustancias que se producen a partir de linfocitos, macrófagos y otras células y que participan en respuestas inflamatorias asociadas con infecciones bacterianas o virales, tumores o daños histológicos. Por ejemplo, las citoquinas inflamatorias como la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) originalmente tienen funciones útiles como la activación de funciones inmunes contra la invasión de bacterias patógenas, pero se sabe que su sobreproducción continua debido a ciertas causas induce una variedad de enfermedades como artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, diabetes tipo 2 y obesidad (especialmente resistencia a la insulina).

Desde el punto de vista de la neuroinflamación, también se sabe que inducen, por ejemplo, depresión.

15 En este contexto, se han realizado estudios para el desarrollo de fármacos para inhibir la producción de citoquinas inflamatorias como el TNF- α en las condiciones patológicas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, además de los agentes antiinflamatorios convencionales tales como ibuprofeno e indometacina, se han propuesto una variedad de sustancias químicas (por ejemplo, véanse las publicaciones de patentes 1 a 3). Sin embargo, las enfermedades antes mencionadas suelen seguir un curso crónico y pueden requerir un tratamiento prolongado. Por tanto, es
20 particularmente deseable proporcionar un compuesto seguro y sin efectos secundarios.

Desde el punto de vista antes mencionado, algunos estudios (literatura de patentes 4 y 5) han propuesto inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias que contienen zumo y/o extracto de fruta, o la glicoproteína lactoferrina, que se enlaza al hierro, en lugar de compuestos orgánicos, como ingrediente activo principalmente para la finalidad de garantizar la seguridad.

25 Un componente extraído de los tomates tiene un excelente efecto al inhibir la producción de citoquinas inflamatorias. A continuación, se divulga un extracto de tomate que inhibe significativamente la producción de citoquinas inflamatorias, particularmente IL-6 y TNF- α .

Mientras tanto, el uso de un extracto de tomate como agente antialérgico se ha propuesto anteriormente (literatura de patente 6).

30 El agente antialérgico propuesto en esta literatura de patente se debe al efecto de inhibir la liberación de mediadores químicos tales como histamina y leucotrienos de los mastocitos de acuerdo con el mecanismo patogénico real de las enfermedades alérgicas, y no tiene como objetivo inhibir la producción de citoquinas inflamatorias como en la presente invención.

Desde este punto de vista, se espera que los extractos de tomate tengan diversas acciones farmacológicas.

35 Lista de citaciones

Literatura de patentes

Literatura de patente 1: JP 2015-174850 A

Literatura de patentes 2: JP 2014-101329 A

Literatura de patentes 3: JP 2009-013106 A

40 Literatura de patentes 4: JP 2005-089304 A

Literatura de patentes 5: JP 2006-069995 A

Literatura de patentes 6: JP 2002-080387 A

45 Se muestran extractos de tomate con inhibidores de la producción de citoquinas y para prevenir la inflamación, en cada uno de los documentos WO 2014/102546 A1, WO 2007/068773 A1, y J. Schwager et al., "Tomato Aqueous Extract Modulates the Inflammatory Profile of Immune Cells and Endothelial Cells", Molecules, vol. 21, núm. 168, 29 de enero de 2016, páginas 1-15.

Young-II Kim et al., "Tomato extract suppresses the production of proinflammatory mediators induced by interaction between adipocytes and macrophages", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, vol 79, no. 1, 2 de enero de

2015, páginas 82-87, muestra fracciones de extracto de tomate con potencial para suprimir la inflamación al inhibir la producción de NO o citoquinas proinflamatorias durante la interacción entre adipocitos y macrófagos.

5 G. Tommonaro et al., "Chemical, pharmacological and biotechnological application by industrial tomato waste and analysis of antioxidative compounds in tomato hybrids", Current Topics in Biotechnology, vol. 4, 30 de noviembre de 2007, páginas 109-117, reporta una fracción de polisacárido proveniente de productos y subproductos de la industria del tomate y muestra que el polisacárido inhibe la activación de NF- κ B al impedir la producción de especies reactivas y sugiere para este compuesto un papel en el control del estrés oxidativo y/o la inflamación.

10 S. Navarrete et al., "Aqueous Extract of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and Ferulic Acid Reduce the Expression of TNF- α and IL-1 β in LPS-Activated macrophages", Molecules, vol. 20, núm. 8, 21 de agosto de 2015, páginas 15319-15329, informan que un extracto de tomate tiene una actividad inhibidora de la expresión de las citoquinas TNF- α e IL-1 β al inhibir la activación de NF- κ B, lo que sugiere que los tomates y el ácido ferúlico pueden contribuir a la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas.

Resumen de la invención

Problema técnico

15 Por consiguiente, la presente invención tiene como objetivo proporcionar inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias que inhiben la producción de las citoquinas inflamatorias TNF- α e IL-6 y pueden aplicarse a fármacos eficaces contra enfermedades inflamatorias causadas por la sobreproducción de estas citoquinas inflamatorias, tales como la artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y diabetes tipo 2.

Solución al problema

20 La presente invención se define en las reivindicaciones.

Efectos ventajosos de la invención

La presente invención proporciona inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias que son altamente seguros mediante administración oral o ingestión.

25 Los inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias proporcionados por la presente invención inhiben la sobreproducción de citoquinas inflamatorias tales como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF- α). Por tanto, estos inhibidores sirven como agentes terapéuticos eficaces contra una variedad de enfermedades causadas por la sobreproducción de estas citoquinas, como la artritis reumatoide, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, así como diabetes tipo 2, depresión y obesidad. Además, estos inhibidores tienen la ventaja de proporcionar atención sanitaria diaria de forma eficaz mediante la ingestión oral diaria.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra los resultados después de tres horas del Ejemplo Experimental 1.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados después de seis horas del Ejemplo Experimental 1.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra los resultados después de tres horas del Ejemplo Experimental 2.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados después de seis horas del Ejemplo Experimental 2.

35 La Fig. 5 es un gráfico que muestra los resultados después de tres horas del Ejemplo Experimental 3.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra los resultados después de seis horas del Ejemplo Experimental 3.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra los resultados después de tres horas del Ejemplo Experimental 4 como ejemplo comparativo.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra los resultados después de tres horas del Ejemplo Experimental 5.

40 La Fig. 9 es un gráfico que muestra los resultados después de seis horas del Ejemplo Experimental 5.

La Fig. 10 es un gráfico que muestra los resultados después de tres horas del Ejemplo Experimental 6.

La Fig. 11 es un gráfico que muestra los resultados después de seis horas del Ejemplo Experimental 6.

La Fig. 12 es un gráfico que muestra los resultados después de tres horas del Ejemplo Experimental 7.

La Fig. 13 es un gráfico que muestra los resultados después de seis horas del Ejemplo Experimental 7.

Descripción de realizaciones

Como se describió anteriormente, los productos divulgados incluyen inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias que contienen un extracto de tomate como ingrediente activo. La invención se define en las reivindicaciones.

5 El extracto de tomate, que es un ingrediente activo de los inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias, es un extracto que se obtiene homogeneizando tomates crudos maduros y eliminando sólidos, es decir, que se obtiene del jugo exprimido.

El material de tomate puede ser de cualquier cultivar. Se puede utilizar cualquier cultivar que se consuma crudo o procesado y que esté comúnmente disponible en el mercado.

10 En la preparación de zumo exprimido de tomates secos, generalmente se homogeneizan junto con una solución reguladora adecuada, como agua purificada o solución salina. Los tomates crudos maduros que tienen un alto contenido de agua se pueden triturar directamente sin utilizar una solución reguladora y después se pueden eliminar los sólidos mediante un método habitual tal como centrifugación para obtener zumo exprimido.

15 Luego, de este jugo exprimido se obtiene un extracto de tomate. La extracción se lleva a cabo utilizando un ultrafiltro centrífugo para obtener el extracto como una fracción que tiene un peso molecular de 10,000 o superior o, dado que el jugo exprimido de tomates crudos contiene una gran cantidad de sacáridos, el extracto se ajusta preferiblemente a 10,000 o superior con base en el peso molecular.

Los ejemplos del ultrafiltro centrífugo utilizado incluyen una variedad de filtros que pueden ser adecuados para el fraccionamiento de peso molecular objetivo, como la serie Amicon Ultra® disponible en Merck Millipore.

20 Se obtiene un extracto que tiene un peso molecular de 10,000 o superior como extracto de tomate crudo. El extracto resultante se puede utilizar tal cual. Alternativamente, puede prepararse en un líquido concentrado mediante evaporación del disolvente o prepararse en un producto seco antes de su uso.

El secado puede llevarse a cabo mediante una técnica de secado habitual tal como secado bajo vacío, liofilización o secado por aspersión. Entre estos, la liofilización se realiza preferentemente para formar un producto seco.

25 El extracto de tomate crudo tiene un efecto excelente en la inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α , y es útil como inhibidor de la producción de citoquinas inflamatorias.

30 Los inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias de la presente invención se pueden administrar de cualquier manera de acuerdo con el propósito de la administración, el tipo de enfermedad y los síntomas particulares. Los inhibidores pueden estar en la forma de dosificación de un comprimido, una cápsula, gránulos, polvo, un medicamento en polvo, líquido u otras formas para administración directa o pueden mezclarse con un alimento o agua potable para su administración, y deseablemente se administran por vía oral.

Estas formas de dosificación pueden prepararse mediante métodos convencionales habituales. Se pueden incorporar aditivos apropiados tales como dextrina, lactosa, almidón de maíz, emulsionantes, antisépticos, vehículos, agentes para expansión, agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes siempre que no se perjudique el efecto ventajoso de la presente invención.

35 Los inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias de la presente invención también se pueden usar como alimentos o bebidas. Ejemplos de dichos alimentos o bebidas incluyen bebidas no alcohólicas tales como refrescos y zumos, bebidas alcohólicas, bebidas fermentadas como yogur, dulces duros como comprimidos y caramelos, dulces masticables como goma de mascar y gomitas, suplementos nutricionales que contienen, por ejemplo, vitaminas, minerales, aminoácidos o proteínas y otras formas.

40 Ejemplos de dichos alimentos o bebidas funcionalmente incluyen alimentos para usos de salud específicos ("TOKUHO"), alimentos con afirmaciones de función nutritiva y alimentos con afirmaciones de función.

Los agentes, alimentos y bebidas anteriores tienen la capacidad de inhibir la producción de citoquinas inflamatorias y pueden ser muy útiles para la prevención, tratamiento, mejora o prevención de recaídas de una variedad de afecciones patológicas inducidas por la sobreproducción de citoquinas inflamatorias.

45 Para los inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias de la presente invención, la dosis para lograr la capacidad de inhibir la producción de citoquinas inflamatorias puede variar de acuerdo con el propósito de la administración, el tipo de enfermedad y los síntomas particulares. Por ejemplo, la cantidad se puede ajustar de modo que se puedan ingerir por día de 1 a 5000 mg, preferiblemente de 5 a 1000 mg, más preferiblemente de 10 a 200 mg, del extracto de tomate crudo.

50 El extracto de tomate crudo se obtiene del jugo exprimido de tomates maduros que se consumen a diario y, por lo tanto, es muy seguro y no causa problemas de toxicidad en las dosis utilizadas en la presente invención.

Ejemplos

Aspectos de la presente invención se describen con más detalle a continuación con referencia a ejemplos y ejemplos experimentales.

Ejemplo 1: Preparación de extracto de tomate crudo

5 Se cortó y trituró en un mortero una cantidad de 103.96 g de tomates crudos maduros (cultivados en la prefectura de Kagoshima). El material resultante se centrifugó a 4000 x g durante 15 minutos y se recolectaron 27.5 ml de la porción líquida.

Una porción de 20 ml de la porción líquida se sometió a ultrafiltración centrífuga a 4000 x g utilizando el ultrafiltro centrífugo Amicon Ultra-15 (MWCO: 10,000).

10 Después de la centrifugación, se tomaron y liofilizaron una fracción de alto peso molecular que tenía un peso molecular de 10,000 o superior y una fracción de bajo peso molecular que tenía un peso molecular de 10,000 o inferior para obtener extractos de tomate crudo.

El extracto de tomate crudo preparado como se indicó anteriormente contiene principalmente sacáridos con algunas proteínas y puede usarse directamente como inhibidor de la producción de citoquinas inflamatorias.

15 El extracto de tomate crudo en la presente invención corresponde a la fracción de peso molecular que tiene un peso molecular de 10,000 o más preparada como anteriormente, pero con fines de comparación, la fracción de peso molecular preparada que tiene un peso molecular de 10,000 o menos también se sometió a los siguientes experimentos.

20 En los siguientes experimentos, cada uno de los extractos de tomate crudo preparados se ajustó a una concentración de 100 µg/ml en un medio DMEN (medio Eagle modificado por Dulbecco + suero bovino al 10 % + antibiótico/antimicrobiano al 0.1 %) antes de su aplicación a las células.

Ejemplo experimental 1: efecto del extracto de tomate crudo sobre la expresión del ARNm de TNF-α en células microgliales de ratón (MG6) en presencia de LPS

A continuación, se describe un procedimiento específico.

(1) Se sembró una placa de 6 pozos con una línea celular microglial de ratón (MG6) a 1×10^5 células/mL.

25 (2) Después de tres a cuatro días, se aplicó a las células soluciones de cuatro grupos, es decir, control (medio DMEN, 1 ml/pozo), LPS (5 ng/ml) + extracto de tomate crudo de alto peso molecular (100 µg) (volumen de líquido: 1 ml) y extracto de tomate crudo de alto peso molecular (100 µg/ml).

(3) Después de tres horas y después de seis horas, se eliminó el medio de cultivo y se agregaron a cada pozo 0.3 ml de una solución RLT (RNeasy Mini kit, QIAGEN) (que contenía β-mercaptoetanol al 1 %).

30 (4) Las células se rasparon usando un raspador de células.

(5) La suspensión celular se mezcló con 0.3 ml de etanol al 70 %.

(6) La solución anterior se puso en una columna de centrifugación (RNeasy Mini kit, QIAGEN) y se centrifugó a 8000 x g durante un minuto.

35 (7) A la columna de centrifugación se le añadieron 700 µl de una solución RW1 (RNeasy Mini kit, QIAGEN), seguido de centrifugación a 8000 x g durante un minuto.

(8) A la columna de centrifugación se le añadieron 500 µl de una solución de RPE (RNeasy Mini kit, QIAGEN), seguido de centrifugación a 8000 x g durante un minuto. Esta etapa se repitió dos veces.

40 (9) La columna de centrifugación se colocó en un tubo nuevo (1.5 ml) y se agregaron 50 µl de agua libre de RNasa. La mezcla se dejó reposar durante un minuto y luego se centrifugó a 12000 x g durante un minuto. Esta etapa se repitió dos veces.

(10) Se usó una porción de 11 µL de esta solución acuosa con el kit de síntesis de ADNc Versco (Thermoscientific) para preparar ADNc.

(11) La solución de ADNc resultante se diluyó 10 veces con agua libre de RNasa.

45 (12) Esta solución de ADNc diluida se utilizó para determinar la expresión de ARNm de GAPDH y ARNm de TNF-α mediante RT-PCR estándar en tiempo real.

(13) La PCR se realizó utilizando una placa de 96 pozos.

- (14) Cada pozo se cargó con 8.5 µL de agua, 2.5 µL de solución de muestra de ADNc, 1.5 µL de cebadores de detección de ARNm de GAPDH o cebadores de detección de ARNm de TNF-α (sentido + antisentido) y 12.5 µL de mezcla de materia verde Syber.
- 5 (15) Las condiciones del ciclo térmico para la PCR fueron las siguientes: Mantener, 94 ° C, 10 minutos + PCR de 3 etapas (40 ciclos; 94 ° C, 30 minutos + 55 ° C, 30 segundos + 72 ° C, 30 segundos) + Mantener, 72 ° C, 1 minuto.
- (16) Para cada muestra de cada grupo, se determinó el valor de ARNm de TNF-α/ARNm de GAPDH y se convirtió en porcentaje con el valor promedio del control tomado como 100 %.
- (17) Se realizó una prueba de significación estadística mediante análisis de varianza seguido del método de Tukey-Kramer.
- 10 Los resultados son visibles en las Figs. 1 y 2.
- La Fig. 1 muestra los resultados después de tres horas y la Fig. 2 muestra los resultados después de seis horas.
- Como se demuestra a partir de los resultados mostrados en la Fig. 1, se entiende que el extracto de tomate crudo inhibe eficazmente la expresión del ARNm de TNF-α en los resultados después de tres horas.
- 15 **Ejemplo experimental 2:** efecto del extracto de tomate crudo sobre la expresión del ARNm de IL-1β en células microgliales de ratón (MG6) en presencia de LPS
- A continuación, se describe un procedimiento específico, que sigue el Ejemplo Experimental 1.
- (1) Se sembró una placa de 6 pozos con una línea celular microglial de ratón (MG6) a 1×10^5 células/mL.
- (2) Después de tres a cuatro días, se aplicaron a las células soluciones de cuatro grupos, es decir, control (medio DMEN, 1 ml/pozo), LPS (5 ng/ml), LPS (5 ng) + extracto de tomate crudo de alto peso molecular (100 µg) (volumen de líquido: 1 ml) y extracto de tomate crudo de alto peso molecular (100 µg/ml).
- 20 (3) Después de tres horas y después de seis horas, se eliminó el medio de cultivo y se agregaron a cada pozo 0.3 ml de una solución RLT (RNeasy Mini kit, QIAGEN) (que contenía β-mercaptoetanol al 1%).
- (4) Las células se rasparon usando un raspador de células.
- (5) La suspensión celular se mezcló con 0.3 ml de etanol al 70 %.
- 25 (6) La solución anterior se puso en una columna de centrifugación (RNeasy Mini kit, QIAGEN) y se centrifugó a 8000 x g durante un minuto.
- (7) A la columna de centrifugación se le añadieron 700 µl de una solución RW1 (RNeasy Mini kit, QIAGEN), seguido de centrifugación a 8000 x g durante un minuto.
- 30 (8) A la columna de centrifugación se le añadieron 500 µl de una solución de RPE (RNeasy Mini kit, QIAGEN), seguido de centrifugación a 8000 x g durante un minuto. Esta etapa se repitió dos veces.
- (9) La columna de centrifugación se colocó en un tubo nuevo (1.5 ml) y se agregaron 50 µl de agua libre de RNasa. La mezcla se dejó reposar durante un minuto y luego se centrifugó a 12000 x g durante un minuto. Esta etapa se repitió dos veces.
- 35 (10) Se usó una porción de 11 µL de esta solución acuosa con el kit de síntesis de ADNc Versco (Thermoscientific) para preparar ADNc.
- (11) La solución de ADNc resultante se diluyó 10 veces con agua libre de RNasa.
- (12) Esta solución de ADNc diluida se utilizó para determinar la expresión de ARNm de GAPDH y ARNm de IL-1β mediante RT-PCR estándar en tiempo real.
- (13) La PCR se realizó utilizando una placa de 96 pozos.
- 40 (14) Cada pozo se cargó con 8.5 µL de agua, 2.5 µL de solución de muestra de ADNc, 1.5 µL de cebadores de detección de ARNm de GAPDH o cebadores de detección de ARNm de IL-1β (sentido + antisentido) y 12.5 µL de mezcla de materia verde Syber.
- (15) Las condiciones del ciclo térmico para la PCR fueron las siguientes: Mantener, 94 ° C, 10 minutos + PCR de 3 etapas (40 ciclos; 94 ° C, 30 minutos + 55 ° C, 30 segundos + 72 ° C, 30 segundos) + Mantener, 72 ° C, 1 minuto.
- 45 (16) Para cada muestra de cada grupo, se determinó el valor de ARNm de IL-1β/ARNm de GAPDH y se convirtió en porcentaje con el valor promedio del control tomado como 100 %.

(17) Se realizó una prueba de significación estadística mediante análisis de varianza seguido del método de Tukey-Kramer.

Los resultados son visibles en las Figs. 3 y 4.

La Fig. 3 muestra los resultados después de tres horas y la Fig. 4 muestra los resultados después de seis horas.

- 5 Como se demuestra a partir de los resultados mostrados en la figura, se entiende que el extracto de tomate crudo inhibe eficazmente la expresión del ARNm de IL-1 β en los resultados después de tres horas.

Ejemplo experimental 3: efecto del extracto de tomate crudo sobre la expresión del ARNm de IL-6 en células microgliales de ratón (MG6) en presencia de LPS

A continuación, se describe un procedimiento específico, que sigue el Ejemplo Experimental 1.

- 10 (1) Se sembró una placa de 6 pozos con una línea celular microglial de ratón (MG6) a 1×10^5 células/mL.
- (2) Después de tres a cuatro días, se aplicaron a las células soluciones de cuatro grupos, es decir, control (medio DMEN, 1 ml/pozo), LPS (5 ng/ml), LPS (5 ng) + extracto de tomate crudo de alto peso molecular (100 μ g) (volumen de líquido: 1 ml) y extracto de tomate crudo de alto peso molecular (100 μ g/ml).
- 15 (3) Después de tres horas y después de seis horas, se eliminó el medio de cultivo y se agregaron a cada pozo 0.3 ml de una solución RLT (RNeasy Mini kit, QIAGEN) (que contenía β -mercaptoetanol al 1%).
- (4) Las células se rasparon usando un raspador de células.
- (5) La suspensión celular se mezcló con 0.3 ml de etanol al 70 %.
- (6) La solución anterior se puso en una columna de centrifugación (RNeasy Mini kit, QIAGEN) y se centrifugó a 8000 x g durante un minuto.
- 20 (7) A la columna de centrifugación se le añadieron 700 μ l de una solución RW1 (RNeasy Mini kit, QIAGEN), seguido de centrifugación a 8000 x g durante un minuto.
- (8) A la columna de centrifugación se le añadieron 500 μ l de una solución de RPE (RNeasy Mini kit, QIAGEN), seguido de centrifugación a 8000 x g durante un minuto. Esta etapa se repitió dos veces.
- 25 (9) La columna de centrifugación se colocó en un tubo nuevo (1.5 ml) y se agregaron 50 μ l de agua libre de RNasa. La mezcla se dejó reposar durante un minuto y luego se centrifugó a 12000 x g durante un minuto. Esta etapa se repitió dos veces.
- (10) Se usó una porción de 11 μ l de esta solución acuosa con el kit de síntesis de ADNc Versco (Thermoscientific) para preparar ADNc.
- (11) La solución de ADNc resultante se diluyó 10 veces con agua libre de RNasa.
- 30 (12) Esta solución de ADNc diluida se utilizó para determinar la expresión de ARNm de GAPDH y ARNm de IL-6 mediante RT-PCR estándar en tiempo real.
- (13) La PCR se realizó utilizando una placa de 96 pozos.
- 35 (14) Cada pozo se cargó con 8.5 μ l de agua, 2.5 μ l de solución de muestra de ADNc, 1.5 μ l de cebadores de detección de ARNm de GAPDH o cebadores de detección de ARNm de IL-6 (sentido + antisentido) y 12.5 μ l de mezcla de materia verde Syber.
- (15) Las condiciones del ciclo térmico para la PCR fueron las siguientes: Mantener, 94 ° C, 10 minutos + PCR de 3 etapas (40 ciclos; 94 ° C, 30 min + 55 ° C, 30 segundos + 72 ° C, 30 segundos) + Mantener, 72 ° C, 1 minuto.
- (16) Para cada muestra de cada grupo, se determinó el valor de ARNm de IL-6/ARNm de GAPDH y se convirtió en porcentaje con el valor promedio del control tomado como 100 %.
- 40 (17) Se realizó una prueba de significación estadística mediante análisis de varianza seguido del método de Tukey-Kramer.
- Los resultados son visibles en las Figs. 5 y 6.
- La Fig. 5 muestra los resultados después de tres horas y la Fig. 6 muestra los resultados después de seis horas.
- Como se demuestra a partir de los resultados mostrados en las figuras, se entiende que el extracto de tomate crudo inhibe eficazmente la expresión del ARNm de IL-6 en los resultados después de tres horas y después de seis horas.
- 45

Ejemplo Experimental 4: efecto del extracto de tomate crudo sobre la expresión de ARNm de TNF- α en células microgliales de ratón (MG6) en presencia de LPS

A efectos de comparación, la fracción de bajo peso molecular (peso molecular: 10,000 o menos) como extracto de tomate crudo se analizó para el efecto de inhibir la producción de citoquinas inflamatorias.

- 5 El análisis se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo Experimental 1, pero utilizando 100 μ g/mL de extracto de tomate crudo de bajo peso molecular.

Los resultados se muestran en la Fig. 7.

- 10 Como se demuestra a partir de los resultados mostrados en la Fig. 7, se encuentra que el extracto de tomate crudo de bajo peso molecular no tiene ningún efecto en la inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias, mientras que el extracto de tomate crudo de fracción de alto peso molecular que tiene un peso molecular de 10,000 o más, se ha descubierto que tienen el efecto de inhibir la producción de citoquinas inflamatorias.

Ejemplo experimental 5: efecto del extracto de tomate crudo sobre la expresión de ARNm de TNF- α en macrófagos de ratón (Raw264) en presencia de LPS

- 15 El análisis se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo Experimental 1, pero utilizando una línea celular de macrófagos de ratón (Raw264) en lugar de la línea celular microglial de ratón (MG6).

En concreto, el análisis se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento específico.

- (1) Se sembró una placa de 6 pozos con una línea celular de macrófagos de ratón (Raw264) a 1×10^5 células/mL.
- (2) Después de tres a cuatro días, se aplicaron a las células soluciones de cuatro grupos, es decir, control (medio DMEN, 1 ml/pozo), LPS (5 ng/ml), LPS (5 ng) + extracto de tomate crudo de alto peso molecular (100 μ g) (volumen de líquido: 1 ml) y extracto de tomate crudo de alto peso molecular (100 μ g/ml).
- (3) Después de tres horas y después de seis horas, se eliminó el medio de cultivo y se agregaron a cada pozo 0.3 ml de una solución RLT (RNeasy Mini kit, QIAGEN) (que contenía β -mercaptoetanol al 1%).
- (4) Las células se rasparon usando un raspador de células.
- (5) La suspensión celular se mezcló con 0.3 ml de etanol al 70 %.
- 25 (6) La solución anterior se puso en una columna de centrifugación (RNeasy Mini kit, QIAGEN) y se centrifugó a 8000 x g durante un minuto.
- (7) A la columna de centrifugación se le añadieron 700 μ l de una solución RW1 (RNeasy Mini kit, QIAGEN), seguido de centrifugación a 8000 x g durante un minuto.
- 30 (8) A la columna de centrifugación se le añadieron 500 μ l de una solución de RPE (RNeasy Mini kit, QIAGEN), seguido de centrifugación a 8000 x g durante un minuto. Esta etapa se repitió dos veces.
- (9) La columna de centrifugación se colocó en un tubo nuevo (1.5 ml) y se agregaron 50 μ l de agua libre de RNasa. La mezcla se dejó reposar durante un minuto y luego se centrifugó a 12000 x g durante un minuto. Esta etapa se repitió dos veces.
- 35 (10) Se usó una porción de 11 μ L de esta solución acuosa con el kit de síntesis de ADNc Versco (Thermoscientific) para preparar ADNc.
- (11) La solución de ADNc resultante se diluyó 10 veces con agua libre de RNasa.
- (12) Esta solución de ADNc diluida se utilizó para determinar la expresión de ARNm de GAPDH y ARNm de TNF- α mediante RT-PCR estándar en tiempo real.
- (13) La PCR se realizó utilizando una placa de 96 pozos.
- 40 (14) Cada pozo se cargó con 8.5 μ L de agua, 2.5 μ L de solución de muestra de ADNc, 1.5 μ L de cebadores de detección de ARNm de GAPDH o cebadores de detección de ARNm de TNF- α (sentido + antisentido) y 12.5 μ L de mezcla de materia verde Syber.
- (15) Las condiciones del ciclo térmico para la PCR fueron las siguientes: Mantener, 94 ° C, 10 minutos + PCR de 3 etapas (40 ciclos; 94 ° C, 30 minutos + 55 ° C, 30 segundos + 72 ° C, 30 segundos) + Mantener, 72 ° C, 1 minuto.
- 45 (16) Para cada muestra de cada grupo, se determinó el valor de ARNm de TNF- α /ARNm de GAPDH y se convirtió en porcentaje con el valor promedio del control tomado como 100 %.

(17) Se realizó una prueba de significación estadística mediante análisis de varianza seguido del método de Tukey-Kramer.

Los resultados son visibles en las Figs. 8 y 9.

La Fig. 8 muestra los resultados después de tres horas y la Fig. 9 muestra los resultados después de seis horas.

- 5 Como se demuestra a partir de los resultados mostrados en la Fig. 9, se entiende que el extracto de tomate crudo inhibe eficazmente la expresión del ARNm de TNF- α en los resultados después de seis horas.

Ejemplo experimental 6: efecto del extracto de tomate crudo sobre la expresión del ARNm de IL-1 β en macrófagos de ratón (Raw264) en presencia de LPS

El análisis se realizó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo Experimental 5.

- 10 Específicamente,

(1) Se sembró una placa de 6 pozos con una línea celular de macrófagos de ratón (Raw264) a 1×10^5 células/mL.

(2) Después de tres a cuatro días, soluciones de cuatro grupos, es decir, control (medio DMEN, 1 ml/pozo), LPS (5 ng/ml), LPS (5 ng) + extracto de tomate crudo de alto peso molecular (100 μ g) (volumen de líquido: 1 ml) y extracto de tomate crudo de alto peso molecular (100 μ g/ml) se aplicó a las células.

- 15 (3) Después de tres horas y después de seis horas, se eliminó el medio de cultivo y se agregaron a cada pozo 0.3 ml de una solución RLT (RNeasy Mini kit, QIAGEN) (que contenía β -mercaptoetanol al 1 %).

(4) Las células se rasparon usando un raspador de células.

(5) La suspensión celular se mezcló con 0.3 ml de etanol al 70 %.

- 20 (6) La solución anterior se puso en una columna de centrifugación (RNeasy Mini kit, QIAGEN) y se centrifugó a 8000 x g durante un minuto.

(7) A la columna de centrifugación se le añadieron 700 μ l de una solución RW1 (RNeasy Mini kit, QIAGEN), seguido de centrifugación a 8000 x g durante un minuto.

(8) A la columna de centrifugación se le añadieron 500 μ l de una solución de RPE (RNeasy Mini kit, QIAGEN), seguido de centrifugación a 8000 x g durante un minuto. Esta etapa se repitió dos veces.

- 25 (9) La columna de centrifugación se colocó en un tubo nuevo (1.5 ml) y se agregaron 50 μ l de agua libre de RNasa. La mezcla se dejó reposar durante un minuto y luego se centrifugó a 12000 x g durante un minuto. Esta etapa se repitió dos veces.

(10) Se usó una porción de 11 μ l de esta solución acuosa con el kit de síntesis de ADNc Versco (Thermoscientific) para preparar ADNc.

- 30 (11) La solución de ADNc resultante se diluyó 10 veces con agua libre de RNasa.

(12) Esta solución de ADNc diluida se utilizó para determinar la expresión de ARNm de GAPDH y ARNm de IL-1 β mediante RT-PCR estándar en tiempo real.

(13) La PCR se realizó utilizando una placa de 96 pozos.

- 35 (14) Cada pozo se cargó con 8.5 μ l de agua, 2.5 μ l de solución de muestra de ADNc, 1.5 μ l de cebadores de detección de ARNm de GAPDH o cebadores de detección de ARNm de IL-1 β (sentido + antisentido) y 12.5 μ l de mezcla de materia verde Syber.

(15) Las condiciones del ciclo térmico para la PCR fueron las siguientes: Mantener, 94 ° C, 10 minutos + PCR de 3 etapas (40 ciclos; 94 ° C, 30 minutos + 55 ° C, 30 segundos + 72 ° C, 30 segundos) + Mantener, 72 ° C, 1 minuto.

- 40 (16) Para cada muestra de cada grupo, se determinó el valor de ARNm de IL-1 β /ARNm de GAPDH y se convirtió en porcentaje con el valor promedio del control tomado como 100 %.

(17) Se realizó una prueba de significación estadística mediante análisis de varianza seguido del método de Tukey-Kramer.

Los resultados son visibles en las Figs. 10 y 11.

La Fig. 10 muestra los resultados después de tres horas y la Fig. 11 muestra los resultados después de seis horas.

Ejemplo experimental 7: efecto del extracto de tomate crudo sobre la expresión del ARNm de IL-6 en macrófagos de ratón (Raw264) en presencia de LPS

El efecto sobre la expresión del ARNm de IL-6 se analizó utilizando una línea celular de macrófagos de ratón (Raw264) de acuerdo con los Ejemplos Experimentales 5 y 6.

5 Los resultados son visibles en las Figs. 12 y 13.

La Fig. 12 muestra los resultados después de tres horas y la Fig. 13 muestra los resultados después de seis horas.

A partir de los resultados del análisis anterior en los Ejemplos experimentales 5 a 7, se entiende que el extracto de tomate crudo inhibe significativamente un aumento en la expresión del ARNm de TNF- α causado por la estimulación con LPS, particularmente en la línea celular de macrófagos de ratón (Raw264).

10 Como se puede entender bien a partir de los resultados de los ejemplos experimentales anteriores, el extracto de tomate crudo, que es una fracción de alto peso molecular que tiene un peso molecular de 10,000 o superior, exhibe mejor un efecto de inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias que la fracción de bajo peso molecular. Por tanto, queda demostrado que el extracto de tomate de alto peso molecular de la presente invención tiene un efecto antiinflamatorio.

15 Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias que son altamente seguros mediante administración oral o ingestión.

20 Los inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias proporcionados por la presente invención inhiben la sobreproducción de citoquinas inflamatorias tales como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF- α) y, por tanto, pueden servir como agentes terapéuticos eficaces contra una variedad de enfermedades causadas por la sobreproducción de estas citoquinas, tales como artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, diabetes tipo 2, obesidad (especialmente resistencia a la insulina) y depresión. Además, estos inhibidores tienen la ventaja de proporcionar atención sanitaria diaria de forma eficaz mediante la ingestión oral diaria. Por consiguiente, estos inhibidores tienen una aplicabilidad industrial significativa.

25

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la producción de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) o factor de necrosis tumoral (TNF- α), que es una fracción de extracto de tomate que tiene un peso molecular de 10,000 o superior obtenido por fraccionamiento por peso molecular del jugo exprimido de tomates crudos y de una extracción llevada a cabo mediante un ultrafiltro centrífugo para obtener el extracto como una fracción que tiene un peso molecular de 10,000 o superior, para uso como un medicamento.
2. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho inhibidor está en una forma administrable por vía oral o ingerible por vía oral.
3. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el uso es un uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias causadas por la sobreproducción de estas citoquinas inflamatorias, en donde la enfermedad inflamatoria se selecciona entre artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y diabetes tipo 2 depresión y obesidad.
4. El inhibidor para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en donde en dicho uso, el inhibidor se administra diariamente mediante ingestión oral.

FIG.1

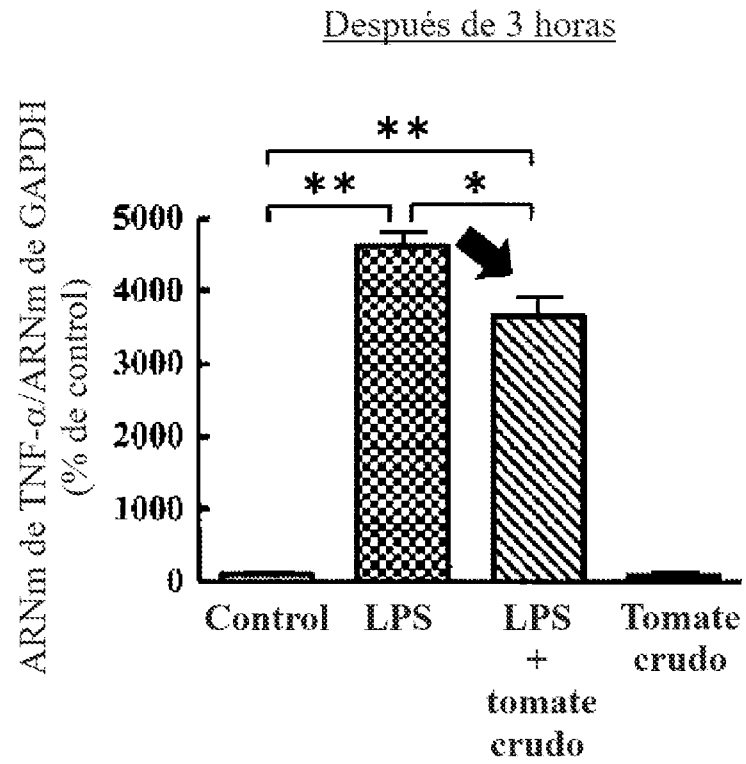


FIG.2

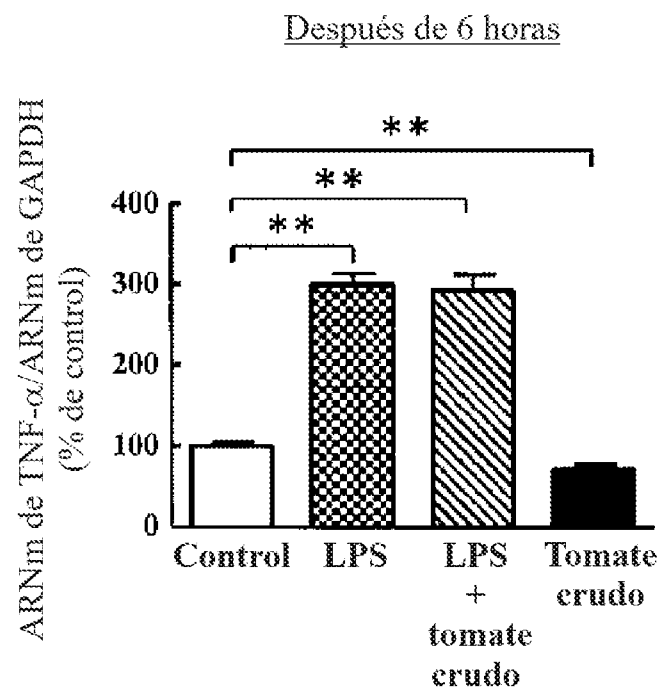


FIG.3

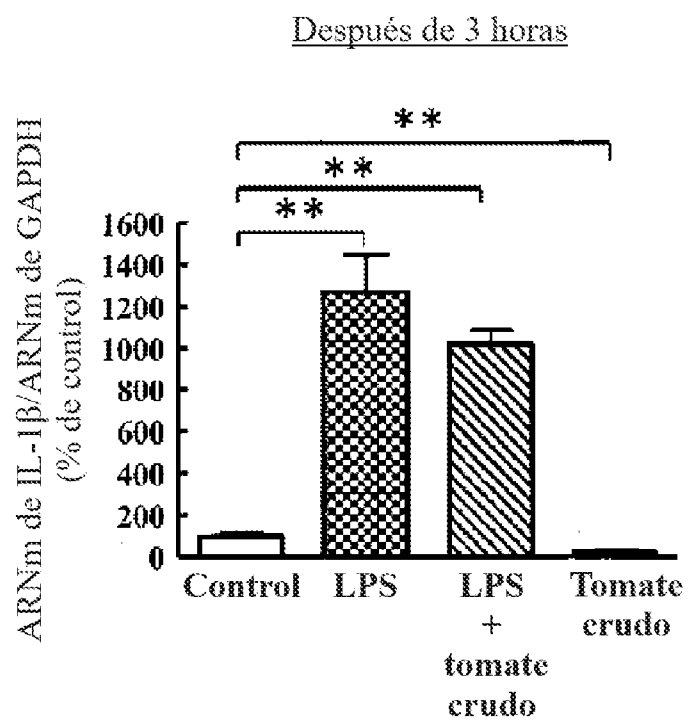


FIG.4

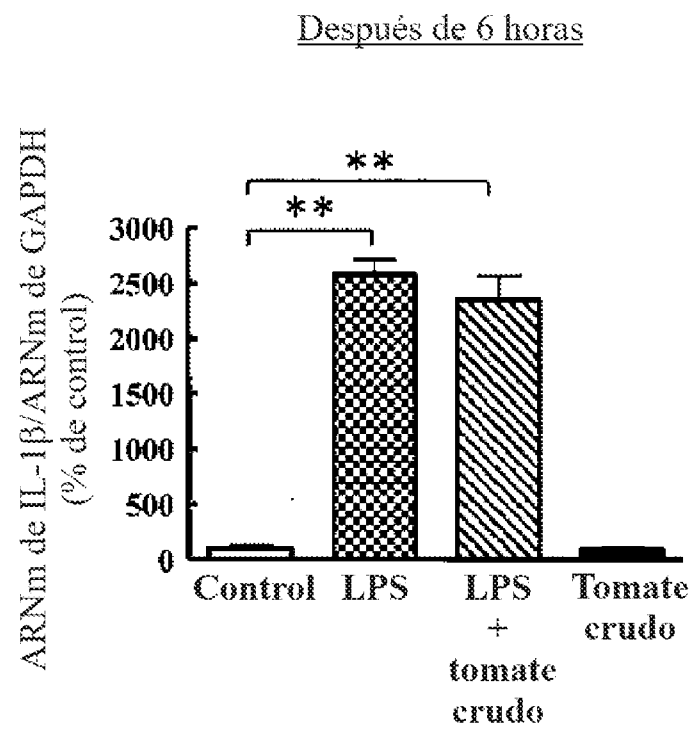


FIG.5

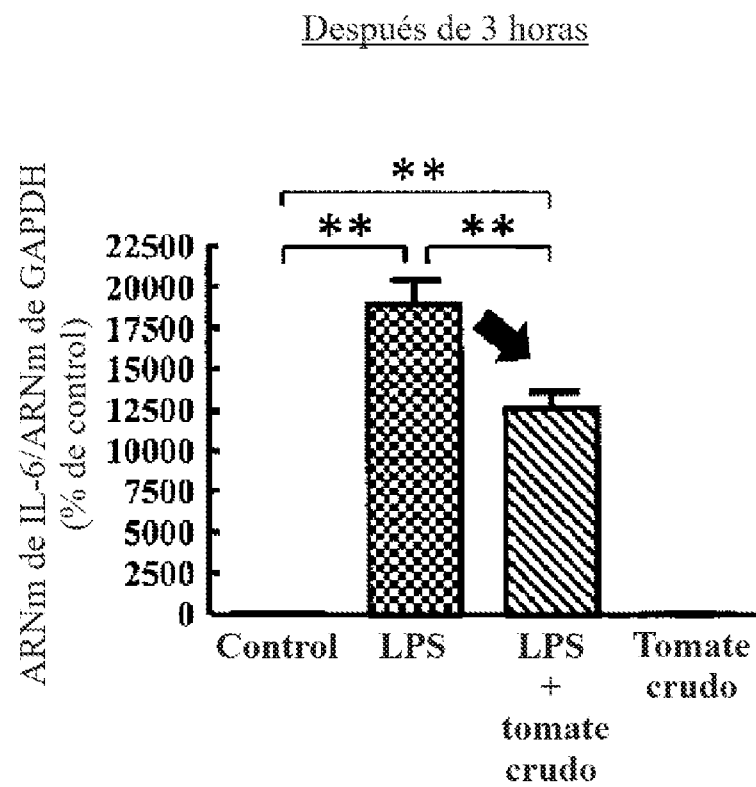


FIG.6

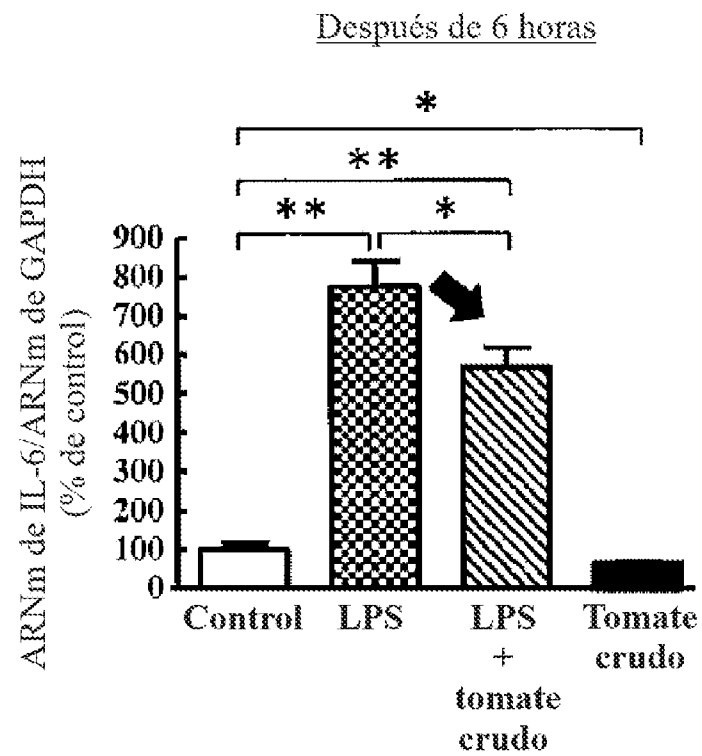


FIG.7

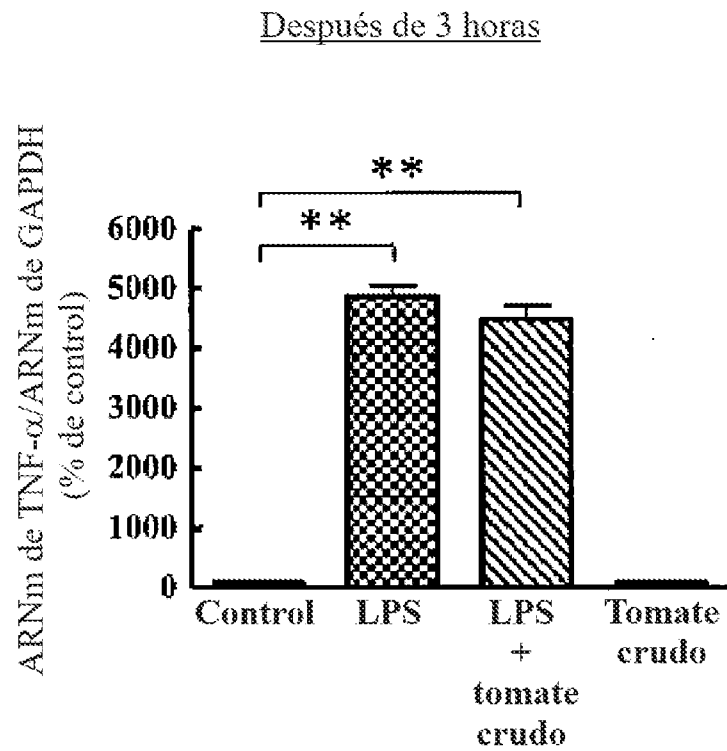


FIG.8

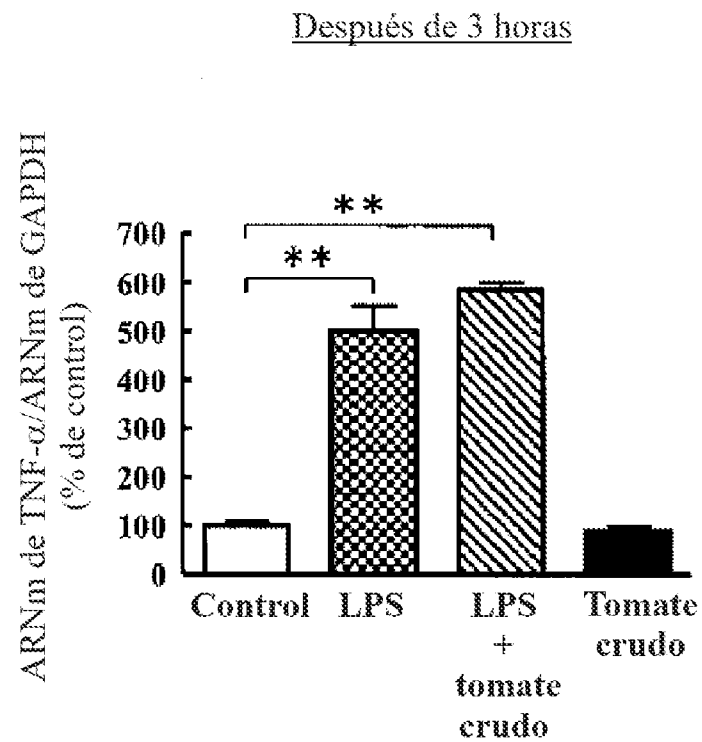


FIG.9

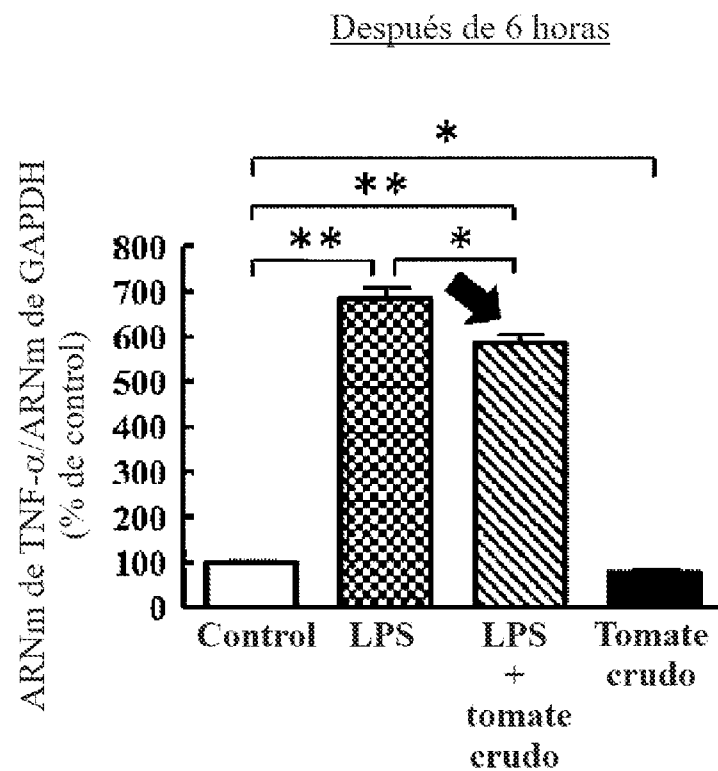


FIG.10

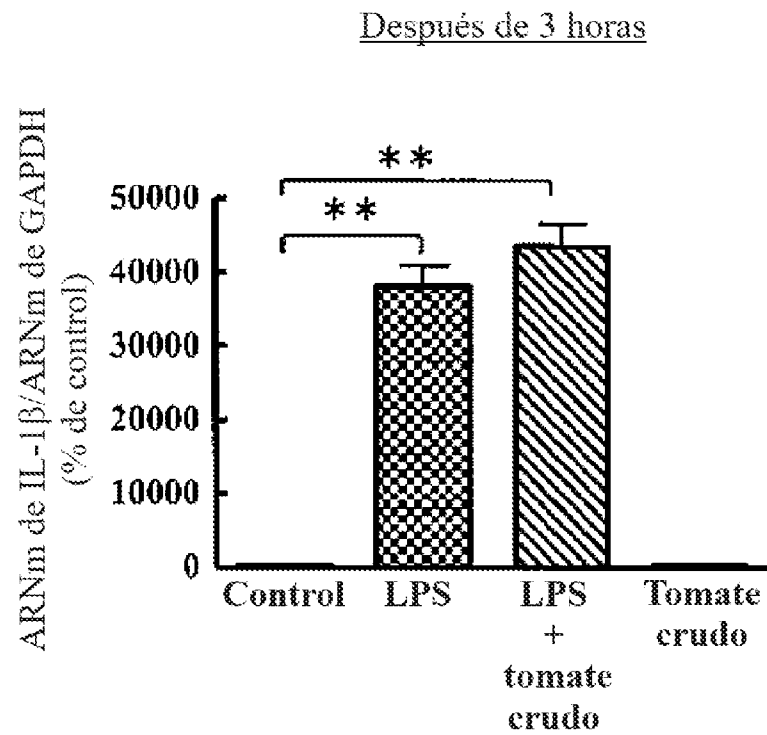


FIG.11

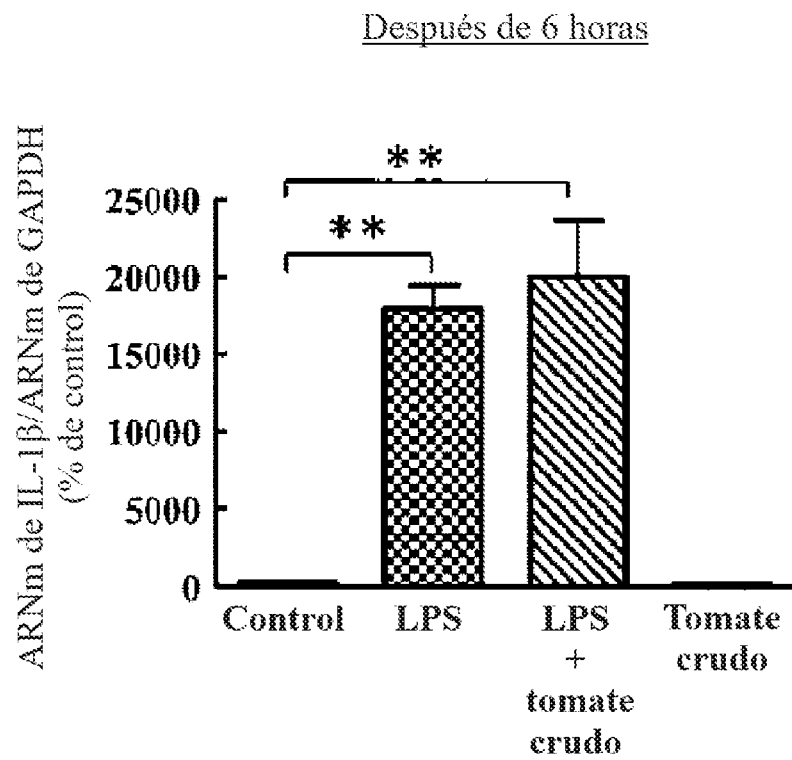


FIG.12

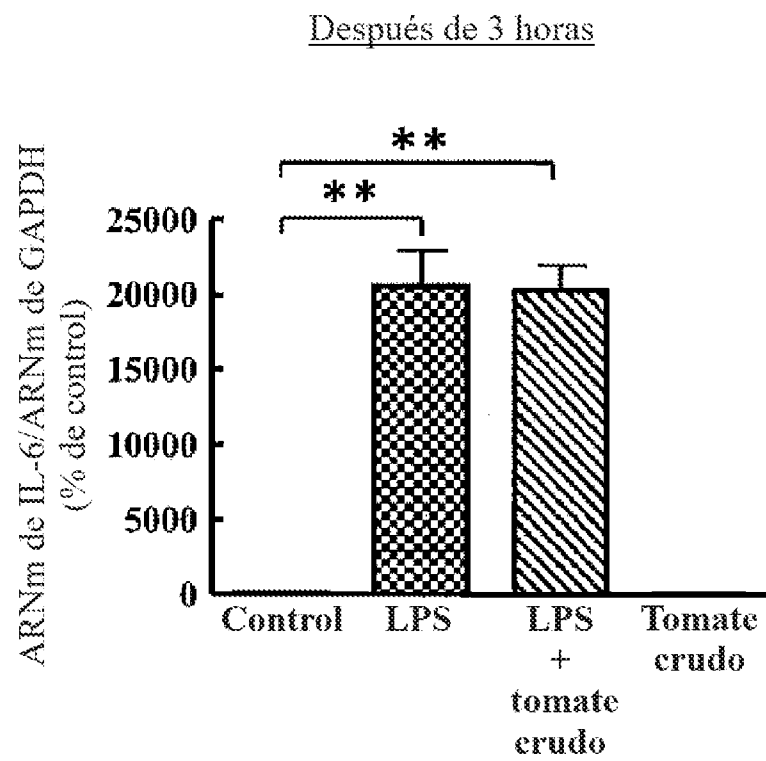


FIG.13

