



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 287 137**

(51) Int. Cl.:

A61K 36/00 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01)

A61K 31/216 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01945660 .7**

(86) Fecha de presentación : **28.06.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1312373**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2003**

(54) Título: **Agentes antialérgicos, fármacos, alimentos, bebidas o cosméticos que los contienen y procedimiento para obtenerlos.**

(30) Prioridad: **28.06.2000 JP 2000-194825**
30.06.2000 JP 2000-198733
30.06.2000 JP 2000-198734

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

(73) Titular/es: **KIKKOMAN CORPORATION**
250 Noda
Noda-shi, Chiba 278-8601, JP

(72) Inventor/es: **Yamamoto, Taichi;**
Kanamori, Tomoko;
Yamaguchi, Fumio;
Saito, Makoto;
Tsuji, Ryohei y
Obata, Akio

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Agentes antialérgicos, fármacos, alimentos, bebidas o cosméticos que los contienen y procedimiento para obtenerlos.

Campo técnico

La presente invención se refiere al uso de un compuesto de naringenin-chalcona en la fabricación de una composición para el tratamiento y prevención de enfermedades alérgicas.

Antecedentes de la técnica

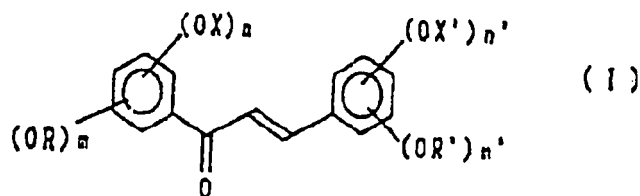
En los últimos años, el número de pacientes con enfermedades alérgicas tales como asma bronquial, polinosis en adultos y dermatitis atópica en niños se ha incrementado, y estas enfermedades se han convertido en un problema social significativo. Actualmente, una de cada tres personas tiene alguna forma de alergia, e incluso se alude a las alergias como una enfermedad nacional. En general, hay cuatro tipos de reacciones alérgicas, que son anafilaxia (tipo I), tipo citotóxico (tipo II), tipo mediado por inmunocomplejos (tipo III) y tipo mediado por células (tipo retardado) (tipo IV). La polinosis, que ha sido particularmente un problema en los últimos tiempos, se clasifica como una alergia del tipo I. También, se piensa que la dermatitis atópica es debida principalmente a una reacción alérgica de tipo I.

En las alergias de tipo I, un anticuerpo IgE, que se produce debido a la invasión de un alérgeno (antígeno), se une a los receptores Fc en las células grasas, y cuando un antígeno reinvador se une a esta IgE se liberan mediadores químicos (sustancias químicas) tales como histamina y leucotrieno desde los gránulos de las células grasas, que a su vez provocan, directa o indirectamente, una reacción inflamatoria aguda acompañada de síntomas tales como asma, rinitis, estornudos, goteo nasal y picor de ojos. Por tanto, cerrar cualquiera de los caminos anteriores podría ser eficaz para prevenir las reacciones alérgicas de tipo I.

Convencionalmente, se ha realizado una investigación extensiva sobre componentes farmacéuticos que tienen acción antialérgica, y se ha informado de que varios compuestos sintéticos tienen tal acción antialérgica. Por ejemplo, se puede esperar que los componentes con actividad para inhibir la liberación de histamina de células grasas o los componentes con actividad para inhibir la liberación de leucotrieno de macrófagos (también denominada actividad inhibitoria de la producción de leucotrieno) sirvan como agentes antialérgicos. Sin embargo, hay muy pocas sustancias de origen natural conocidas por tener una actividad antialérgica. Además, apenas hay alguna sustancia de origen natural que sea segura y tenga una actividad antialérgica adecuada. Por consiguiente, en el campo de la medicina en particular, ha habido una necesidad de buscar compuestos que tengan una actividad antialérgica adecuada y de desarrollar agentes antialérgicos.

Hoshino K., *et al.*: "Evaluation of Antiallergic Effects of Extracts from Ten Kinds of Vegetables Using Three *in vitro* Assay Systems", SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI, vol. 39, nº 2, 1998, páginas 72-77, investigaron la actividad antialérgica *in vitro* de la fracción en etanol al 70% de diez clases de vegetales usando tres tipos de sistemas de ensayo, que se basan en la inhibición de la liberación de histamina de mastocitos peritoneales de rata y células de leucemia basófilas de rata (RBL-2H3), y la inhibición de la actividad de la hialuronidasa. La fracción de col mostró un fuerte efecto antialérgico en todos los ensayos *in vitro*, mientras que la fracción de tomate, col roja y berro mostró fuertes efectos antialérgicos en dos de los ensayos *in vitro*. Estos resultados sugirieron que las fracciones de cuatro vegetales exhiben actividad antialérgica actuando sobre múltiples puntos en una serie de reacciones alérgicas de tipo inmediato.

La Solicitud de Patente Europea EP-A 0 370 461 describe derivados de la chalcona que tienen al menos un grupo tetrahidropiranilo. Típicamente, los compuestos se representan por la fórmula general (I)



en la que X y X' representan cada uno un grupo tetrahidropiranilo, R y R', que son los mismos o diferentes, representan cada uno un grupo alquilo o un átomo de hidrógeno, n y n' son cada uno un número entero de 0 a 5, m y m' son cada uno números enteros de 0 a 5, a condición de que n + n' sea 1 ó más, y de que n + m sea un número entero de 0 a 5 y n' + m' sea un número entero de 0 a 5.

Krause, M., *et al.*: "Determination of naringenin and naringenin-chalcone in tomato skins by reversed phase PLC after solid phase extraction", Z. LEBENSM. UNTERS. FORSCH., vol. 194, nº 1, 1992, páginas 29-32, determinaron la naringenina y la naringenin-chalcona en extractos de piel de tomate por HPLC de fase inversa isocrática después de una extracción en fase sólida C-18. La naringenin-chalcona estaba presente en todas las muestras de tomate

(95%-98%) pero no la flavanona isomérica naringenina (2%-5%). Se concluyó que en investigaciones previas la flavanona naringenina se encontró porque el procedimiento de extracción causó la ciclación espontánea de la chalcona.

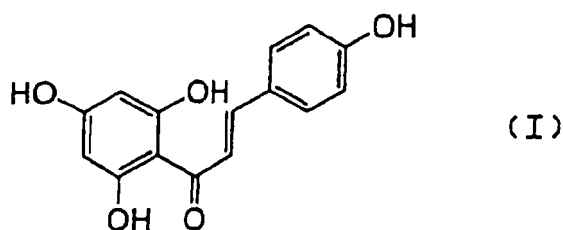
Hunt, G. M. *et al.*: "Phenolic Constituents of Tomato Fruit Cuticles", PHYTOCHEMISTRY, vol. 19, n° 7, 1980, páginas 1415-1419, identificaron chalconaringenina, naringenina, naringenin-7-glucósido, y ácidos m- y p- cumáricos en las cutículas frutales de tres cultivos de tomate. El contenido fenólico de las cutículas se incrementó sustancialmente durante el crecimiento del fruto, rindiendo los frutos verdes inmaduros y los maduros de cv Ailsa Craid, respectivamente 2,8 y 61 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (representando 1,4 y 6% del peso total de la membrana). Los ácidos cumáricos, presentes sólo en los fenólicos "unidos a la cutina", se incrementaron de 2 a 24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante el crecimiento del fruto. Los flavonoides, sintetizados principalmente durante el periodo climacterico, aparecieron libres en los fenólicos epicuticulares (0,3-7,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y cuticulares (0,7-5,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pero la mayor parte de esta clase de constituyentes en las cutículas de fruta madura estaba también "unida" a la matriz de cutina (30-43 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). La composición de la fracción flavonoide fue controlada por la calidad espectral de la radiación incidente, luz roja que favorecía la formación de chalconaringenina.

El objeto de la presente invención es proporcionar nuevos agentes antialérgicos.

Los presentes inventores han realizado estudios extensivos e intensivos para buscar nuevos agentes antialérgicos, usando la actividad inhibitoria de la liberación de histamina como indicador de eficacia en el tratamiento de enfermedades alérgicas. Como resultado, se encontró que los tomates contienen componentes que tienen una actividad antialérgica, y que una fracción que tiene una actividad antialérgica está contenida principalmente en los pericarpios de los tomates. Además, los presentes inventores también encontraron que la fracción anterior que tiene una actividad antialérgica consiste en naringenin-chalcona y los derivados de ácido cafeico, que incluyen el ácido tricafeoilquínico y el ácido dicafeilsuccinilquínico, que tienen actividad inhibitoria de la liberación de histamina, y que son útiles como agentes antialérgicos. Además, se encontró que la actividad antialérgica de estos compuestos es más potente que la de otros derivados de ácido cafeico (tales como ácido cafeico o ácido dicafeoilquínico) conocidos por tener dicha actividad.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere al uso de naringenin-chalcona, representada por la siguiente fórmula (I):



en la fabricación de una composición para el tratamiento y prevención de enfermedades alérgicas.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un espectro de ^1H -RMN del componente inhibidor de la liberación de histamina (naringenin-chalcona) obtenido en los Ejemplos 1 a 3.

La Fig. 2 muestra un espectro de ^{13}C -RMN del componente inhibidor de la liberación de histamina (naringenin-chalcona) obtenido en los Ejemplos 1 a 3.

La Fig. 3 muestra una LC-MS (espectroscopía de masas acoplada a cromatografía de líquidos) del componente inhibidor de la liberación de histamina (naringenin-chalcona) obtenido en los Ejemplos 1 a 3.

La Fig. 4 muestra un espectro de ^1H -RMN del compuesto con la actividad inhibitoria de la liberación de histamina (ácido tricafeoilquínico) obtenido en los Ejemplos 1 a 4.

La Fig. 5 muestra un espectro de ^{13}C -RMN del compuesto con la actividad inhibitoria de la liberación de histamina (ácido tricafeoilquínico) obtenido en los Ejemplos 1 a 4.

La Fig. 6 muestra una LC-MS del compuesto con la actividad inhibitoria de la liberación de histamina (ácido tricafeoilquínico) obtenido en los Ejemplos 1 a 4.

La Fig. 7 muestra los resultados de las mediciones sobre la actividad inhibitoria de la liberación de histamina descrita en el Ejemplo 2 (2).

La Fig. 8 muestra una acción inhibitoria de la naringenin-chalcona sobre la anafilaxia en un modelo de edema auricular en el ratón.

La Fig. 9 muestra una acción inhibitoria del ácido tricafeoilquínico sobre la anafilaxia en un modelo de edema auricular en el ratón.

La Fig. 10 muestra una acción inhibitoria del ácido tricafeoilquínico administrado por vía oral sobre la anafilaxia en un modelo de edema auricular en el ratón.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Lo que sigue proporciona una explicación más detallada de la presente invención.

1. Agentes antialérgicos que comprenden naringenin-chalcona, representada por la fórmula (I), como ingrediente activo

En una realización, el agente antialérgico se caracteriza por comprender un pericarpio de tomate como su ingrediente activo. Esto es debido a que el pericarpio de la materia prima de tomate contiene particularmente una gran cantidad de componentes con actividad antialérgica. Los presentes inventores separaron los residuos de tomate exprimido en pericarpios y semillas, respectivamente, y midieron su actividad antialérgica con respecto a las cantidades iguales de los extractos resultantes. Como resultado, la actividad antialérgica del extracto de pericarpio fue aproximadamente de 5 a 10 veces más alta que la del extracto de las semillas.

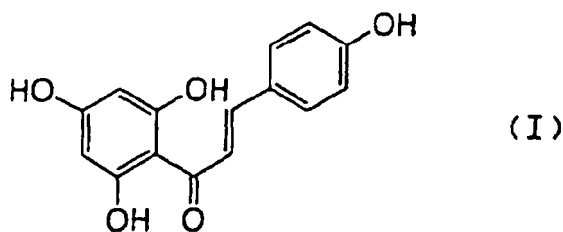
Por tanto, el pericarpio del tomate es extremadamente útil como agente antialérgico. En este caso, el pericarpio del tomate significa, por ejemplo, fruto de tomate seco o los obtenidos triturando el fruto de tomate seco, residuo de tomate exprimido, residuo de tomate exprimido seco, y los obtenidos triturando el residuo de tomate exprimido seco, etcétera. El pericarpio del tomate se prepara preferiblemente en forma de gránulos, polvo, comprimidos o bloques para facilitar su uso como agente antialérgico.

Los agentes antialérgicos que comprenden un pericarpio de tomate como ingrediente activo también pueden contener otros componentes además del pericarpio. Los ejemplos de otros componentes incluyen un vehículo sólido, un vehículo líquido, un vehículo oleoso, un conservante, un desinfectante, una fragancia, un agente aromatizante y un colorante.

Además, tejidos del tomate distintos al pericarpio, tales como pulpa, semillas, etc., también pueden estar contenidos en el agente antialérgico que comprende el pericarpio del tomate como ingrediente activo.

Los presentes inventores han identificado los componentes mostrados a continuación como los componentes activos mencionados anteriormente.

A saber, los agentes antialérgicos de la presente invención comprenden naringenin-chalcona como su ingrediente activo. La naringenin-chalcona (2', 4', 6', 4-tetrahidroxichalcona) es una sustancia representada por la siguiente fórmula (I).



Como se indica en los ejemplos, la naringenin-chalcona exhibe una actividad superior de inhibición de la liberación de histamina desde las células grasas. Además, sus actividades son más potentes que la del ácido cafeico o el ácido dicafeoilquínico. Por tanto, los agentes antialérgicos que comprenden este compuesto como ingrediente activo son útiles como agentes preventivos y terapéuticos para diversas enfermedades alérgicas, como agentes antiinflamatorios o como inhibidores de la liberación de histamina. Los ejemplos de las enfermedades alérgicas incluyen dermatitis atópica, rinitis alérgica, polinosis, asma alérgico, alergias a los alimentos e inflamaciones.

Dado que los agentes antialérgicos de la presente invención inhiben la liberación de histamina de las células grasas en las reacciones alérgicas de tipo I, son útiles en la prevención y el tratamiento de la dermatitis atópica, rinitis alérgica, polinosis, etcétera, causadas de este modo.

2. Procedimiento de producción de agentes antialérgicos

La naringenin-chalcona mencionada anteriormente, que sirve como ingrediente activo de los agentes antialérgicos de la presente invención, se puede producir por cualquier método, y se pueden emplear diversos métodos, que incluyen métodos para purificar este compuesto a partir de organismos vivos que contienen el mismo, métodos de síntesis química y métodos semisintéticos.

La naringenin-chalcona puede ser extraída de plantas tales como frutos cítricos y vegetales, y más específicamente tomate y *Chrysanthemum coronarium*, usando un disolvente que contiene disolvente orgánico. En caso de purificar naringenin-chalcona a partir de tomate, se añade etanol al 60%, en un volumen de 10 veces superior, a pericarpio de tomate o residuo exprimido, y la extracción se lleva a cabo durante 3 horas en un baño de agua caliente mantenido a 60°C. Se obtiene un extracto que contiene naringenin-chalcona y ácido tricafeoilquínico. Este extracto se somete a cromatografía líquida de alta resolución. Después de recoger las fracciones que exhiben actividad inhibitoria de la liberación de histamina, se confirman las estructuras de los compuestos contenidos en cada fracción. Como resultado, la naringenin-chalcona puede ser purificada.

Además, los agentes antialérgicos de la presente invención no se limitan a los que contienen sólo ingrediente activo purificado, sino que también pueden ser productos toscamente purificados que contienen naringenin-chalcona.

Además, se pueden producir sales farmacéuticamente aceptables haciendo reaccionar un metal alcalino, metal alcalinotérreo, alcóxido de metal alcalino, ácido inorgánico o ácido orgánico con naringenin-chalcona. Se pueden producir ésteres haciendo reaccionar alcohol o ácido carboxílico con naringenin-chalcona, en presencia de un catalizador ácido.

3. Uso de agentes antialérgicos de la presente invención

Los agentes antialérgicos de la presente invención comprenden naringenin-chalcona como su ingrediente activo. Como se indica en los Ejemplos, los agentes antialérgicos de la presente invención exhiben una actividad de inhibición de la liberación de histamina desde las células grasas o la liberación de leucotrieno desde los macrófagos. Por tanto, los agentes antialérgicos de la presente invención son útiles como agentes preventivos o terapéuticos contra diversas enfermedades alérgicas, como agentes antiinflamatorios, o como inhibidores de la liberación de histamina o inhibidores de la liberación de leucotrieno. Los ejemplos de enfermedades alérgicas incluyen rinitis alérgica causada por polen, ácaros o polvo casero, dermatitis alérgica, alergias a alimentos causadas en respuesta a alimentos específicos tales como leche o huevos, asma bronquial alérgico e inflamaciones. Los agentes antialérgicos de la presente invención son útiles para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas causadas por reacciones alérgicas de tipo I en particular.

Los agentes antialérgicos de la presente invención se pueden usar como medicamentos, alimentos, bebidas o cosméticos que tienen una actividad antialérgica, actividad antiinflamatoria, actividad inhibitoria de la liberación de histamina o actividad inhibitoria de la liberación de leucotrieno, bien directamente o bien añadiéndose a estos productos.

Los agentes antialérgicos de la presente invención se pueden usar solos para medicamentos, alimentos, bebidas o cosméticos, o se pueden usar en asociación con otros agentes antialérgicos. Además, las mezclas de al menos dos tipos de naringenin-chalcona, ácido tricafeoilquínico y ácido dicafeoilsuccinilquínico también pueden ser los agentes antialérgicos de la presente invención.

A. Medicamentos

Los agentes antialérgicos de la presente invención se pueden usar como medicamentos formulando un extracto de tomate o un pericarpio de tomate por sí mismo, o los compuestos purificados anteriores por sí mismos, o formulando estos con un vehículo farmacéutico conocido en preparaciones. Los agentes antialérgicos de la presente invención se pueden preparar en forma de preparaciones orales que incluyen comprimidos, gránulos, polvos y jarabes, y en forma de preparaciones parenterales que incluyen supositorios y preparaciones externas. No hay restricciones particulares sobre los vehículos farmacéuticos, y los ejemplos incluyen vehículos sólidos (tales como almidón, lactosa y carboximetilcelulosa), vehículos líquidos (tales como agua destilada, una D-glucosa acuosa, etanol, propilenglicol, etc.) y vehículos oleosos (tales como diversos aceites animales y vegetales, Vaselina blanca y parafina).

Los medicamentos anteriores se pueden usar para seres humanos y animales distintos a los seres humanos (tales como mascotas y ganado). Aunque la dosis de los medicamentos anteriores debe ser determinada adecuadamente según los síntomas, el sexo, la edad de los pacientes que los usarán, podrían administrarse, por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente 0,1-1000 mg por día por persona.

B. Alimentos y bebidas

Los agentes antialérgicos de la presente invención se pueden usar por sí mismos para alimentos y bebidas que tienen una actividad antialérgica, actividad antiinflamatoria, actividad inhibitoria de la liberación de histamina o actividad inhibitoria de la liberación de leucotrieno. Además, la actividad anterior puede ser comunicada a alimentos y bebidas añadiendo los agentes antialérgicos de la presente invención a alimentos y bebidas tales como zumo de tomate o puré de tomate.

No hay restricciones particulares sobre los alimentos y bebidas a los cuales se podrían añadir los agentes antialérgicos de la presente invención, y los ejemplos incluyen carnes, vegetales procesados, entrantes preparados, productos lácteos, dulces, panes, refrescos, zumos de frutas y bebidas alcohólicas. No hay formulación específica de los agentes antialérgicos de la presente invención basada en el alimento.

Además, los agentes antialérgicos de la presente invención se pueden mezclar con otros materiales alimenticios y prepararse en forma de gránulos, polvos, comprimidos o bloques, etcétera, para servir como materiales alimenticios, alimentos naturales, etcétera. Los ejemplos de otros materiales alimenticios incluyen azúcares, proteínas comestibles, alcoholes, vitaminas, polisacáridos espesados, aminoácidos, sales de calcio, pigmentos, fragancias y conservantes.

C. Cosméticos

Los agentes antialérgicos de la presente invención se pueden añadir a cosméticos para comunicar una actividad antialérgica, actividad antiinflamatoria, actividad inhibitoria de la liberación de histamina o actividad inhibitoria de la liberación de leucotrieno a los cosméticos. No hay restricciones particulares sobre las clases de cosméticos, y los ejemplos incluyen loción para la piel, crema facial, leche corporal, crema base, barra de labios, spray para el cabello, tónico para el cabello, agente para el crecimiento del cabello, pasta de dientes, enjuagues bucales, champú y tinte.

En la preparación de cosméticos, se pueden mezclar adecuadamente materiales usados normalmente como materias primas cosméticas, tales como grasas y aceites, que incluyen aceites vegetales, ceras, que incluyen lanolina y cera de abejas, hidrocarburos, ácidos grasos, alcoholes superiores, diversos tensioactivos, pigmentos, fragancias, vitaminas, extractos vegetales/animales, absorbentes de los rayos ultravioleta, antioxidantes y conservantes.

4. Inhibidores de la liberación de histamina de la presente invención

Como se indica en los Ejemplos, la naringenin-chalcona exhibe una actividad inhibitoria de la liberación de histamina, por tanto, es útil como inhibidor de la liberación de histamina.

Por tanto, el compuesto anterior se puede usar bien por sí mismo o bien añadiéndose a medicamentos, alimentos, bebidas o cosméticos, para la prevención y el tratamiento de enfermedades para las cuales la inhibición de la liberación de histamina es eficaz. El compuesto anterior se puede usar solo como ingrediente activo de un medicamento, o en combinación de dos o más especies.

La naringenin-chalcona puede incluir derivados en los que una parte de su estructura ha sido alterada o modificada, a condición de que tengan actividad como inhibidores de la liberación de histamina. Los ejemplos de derivados de la naringenin-chalcona incluyen sales farmacéuticamente aceptables, ésteres o pro-medicamentos. Se describen derivados específicos en la sección anterior sobre los agentes antialérgicos.

5. Inhibidores de la liberación de leucotrieno de la presente invención

Como se indica en los Ejemplos, la naringenin-chalcona exhibe actividad inhibitoria de la liberación de leucotrieno, por tanto, es útil como inhibidor de la liberación de leucotrieno (también referido como inhibidor de la producción de leucotrieno).

Por tanto, el compuesto anterior se puede usar bien por sí mismo o bien añadiéndose a medicamentos, alimentos, bebidas o cosméticos, para la prevención y el tratamiento de enfermedades para las cuales la inhibición de la liberación de leucotrieno es eficaz. El compuesto anterior se puede usar solo como ingrediente activo de un medicamento, o en combinación de dos o más especies.

La naringenin-chalcona puede incluir derivados en los que una parte de su estructura ha sido alterada o modificada, a condición de que tengan actividad como inhibidores de la liberación de leucotrieno. Los ejemplos de derivados de la naringenin-chalcona incluyen sales farmacéuticamente aceptables, ésteres o pro-medicamentos. Se describen derivados específicos en la sección anterior sobre los agentes antialérgicos.

Ejemplos

Lo que sigue muestra Ejemplos de métodos de producción de los agentes antialérgicos de la presente invención que comprenden extracto de tomate, etcétera, como su ingrediente activo, ensayos de inhibición de la liberación de histamina, y la producción de medicamentos, alimentos, bebidas y cosméticos que comprenden agentes antialérgicos de la presente invención.

Ejemplo 1

Ejemplo 1-1

Preparación de extracto de tomate (no cae dentro del alcance de la presente invención)

(1) Se trituraron 20 g de residuo de tomate exprimido y seco con un mezclador, y después, se añadieron a esto 200 ml de agua y se calentó la mezcla a reflujo a 60°C para llevar a cabo la extracción en agua para retirar las impurezas.

Posteriormente, el residuo de la extracción se recogió y se sometió a una extracción adicional añadiendo 200 ml de etanol al 60% como disolvente y calentando a reflujo a 70°C. Después de filtrar la disolución del extracto resultante, el filtrado se concentró a presión reducida y se secó por congelación, para dar 812 mg de polvo de extracto de tomate (Extracto de Tomate 1).

Ejemplo 1-2

Purificación de naringenin-chalcona

Se extrajo pericarpio de tomate con etanol al 60% en un baño de agua caliente a 60°C durante 2 horas. El extracto se filtró, y el filtrado resultante se concentró a presión reducida. Se fraccionó por cromatografía líquida de alta resolución (columna: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 15 mm de diámetro x 250 mm; eluyente: acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético al 0,1%/agua = 40/60) para dar un componente inhibitorio de la liberación de histamina. El componente anterior fue identificado utilizando LC-MS, RMN, etcétera. El espectro de ¹H-RMN se muestra en la Fig. 1, el espectro de ¹³C-RMN se muestra en la Fig. 2, y la LC-MS se muestra en la Fig. 3. Se confirmó que dicho compuesto era naringenin-chalcona basándose en los resultados anteriores. Además, la actividad inhibitoria de la liberación de histamina de las fracciones obtenidas en cada etapa de purificación se midió según el método descrito en el Ejemplo 2.

Ejemplo 2

Medición de la actividad inhibitoria de la liberación de histamina de células grasas de rata

(1) La medición de la actividad inhibitoria de la liberación de histamina de células grasas de rata se llevó a cabo según el siguiente método con respecto a la naringenin-chalcona. Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 1.

Se recogieron células de la cavidad abdominal de ratas inmediatamente después de ser sacrificadas por exsanguinación usando un tampón para células grasas que contiene heparina (composición: NaCl 0,150 M, KCl 3,7 mM, Na₂HPO₄ 3,0 mM, KH₂PO₄ 3,5 mM, CaCl₂ 0,9 mM, D-glucosa 5,6 mM, gelatina al 0,1% (p/p) (Lectures on Experimental Biopharmacology, Vol. 12, Inflammations and Allergies II, editado por Kazuo Ohuchi, publicado por Hirokawa Publishing, 1993, página 372). Después de lavar las células, el tampón anterior para células grasas que contiene heparina se añadió hasta una concentración de $2,0 \times 10^5$ células/ml, y esto se usó como suspensión de células.

La naringenin-chalcona obtenida en el Ejemplo 1-2, y ketotifeno fumarato, que es conocido por tener una actividad antialérgica, fueron disueltos respectivamente en el tampón de células grasas que contiene heparina y que contenía DMSO al 0,15% (concentración final), y cada uno de estos se usó como disoluciones de muestra que tenían concentraciones de 25-250 µg/ml.

Se añadieron 80 µl de la suspensión de células anterior a 20 µl de la disolución de muestra y la mezcla se incubó a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 20 µl de Compuesto 48/80 (5 µg/ml) como inductor de la desgranulación de la histamina, y la mezcla se incubó durante 10 minutos. Después de enfriar la mezcla con hielo, se separó por centrifugación (1500 x g, 5 minutos, 4°C), y la histamina libre en el sobrenadante se midió por cromatografía líquida de alta resolución equipada con un detector fluorescente.

La actividad inhibitoria de la liberación de histamina se calculó a partir de los valores medidos de histamina usando la fórmula de cálculo (I) mostrada a continuación.

$$\text{Tasa de inhibición de la liberación de histamina (\%)} = (1 - (S - B) / (C - B)) \times 100 \quad (1)$$

B: Cantidad de histamina liberada de las células de control en ausencia de inductor

C: Cantidad de histamina liberada de las células en presencia de inductor

S: Cantidad de histamina liberada de las células en presencia de muestra de ensayo e inductor

TABLA 1

Muestras	Concentración (µg/ml)	Tasa de inhibición (%)	IC ₅₀
Naringenin-chalcona	200	82,0	Aproximadamente 70 µg/ml
	75	53,9	
	50	37,6	
	25	28,2	

ES 2 287 137 T3

Como queda claro a partir de los resultados mostrados en la Tabla 1, la naringenin-chalcona exhibió una actividad inhibitoria de la liberación de histamina que fue más potente que la del agente antialérgico conocido, ketotifeno fumarato.

En base a lo anterior, se indicó que la naringenin-chalcona es útil como agente antialérgico o inhibidor de la liberación de histamina.

Además, en el caso de la comparación con el agente antialérgico conocido, ketotifeno fumarato, el valor IC_{50} (tasa de inhibición de 50%) de la naringenin-chalcona fue aproximadamente $70 \mu\text{g/ml}$. Esto indica que la actividad de la naringenin-chalcona es aproximadamente 3,5 veces más que la de los agentes conocidos.

Ejemplo 3

Medición de la actividad inhibitoria de la liberación de leucotrieno B_4

La actividad de inhibición de la liberación de leucotrieno B_4 de macrófagos de rata se midió según el siguiente método en muestras de ensayo que consistían en la naringenin-chalcona obtenida en el Ejemplo 1-2, y los resultados se muestran en la Tabla 2.

Se suspendió almidón soluble (Wuako, grado 1) y Bactopeptona (Difco) en suero salino fisiológico (NaCl al 0,9%, Ohtsuka Pharmaceutical, Co.) para tener una concentración de 5% de cada uno. Después de esterilizar con un autoclave (121°C , 20 minutos), se enfrió la suspensión hasta la temperatura ambiente. La suspensión se administró por inyección en la cavidad abdominal de la rata en una cantidad de 5 ml por 100 g de peso corporal bajo anestesia con éter (usando una aguja 21G).

Cuatro días después, se sacrificaron las ratas por exsanguinación de la arteria carótida bajo anestesia con éter. Después de exsanguinar adecuadamente las ratas, se rociaron las ratas con etanol y se colocaron en una mesa limpia. Se inyectaron 25 ml de CMF-HBSS (solución salina tamponada de Hanks exenta de Ca, Mg) en la cavidad abdominal, seguido de un masaje adecuado del abdomen. Las ratas fueron laparotomizadas usando instrumentos esterilizados, y se recogió la disolución de dentro de la cavidad abdominal. La disolución recogida se filtró usando tres capas de gasa. La cavidad abdominal se lavó adicionalmente con 25 ml de CMF-HBSS (HBSS exenta de Ca, Mg), y la disolución se recogió de la misma manera. Las células recogidas se lavaron tres veces con BSA-PBS al 0,1% enfriado en hielo, se suspendieron en medio RPMI1640 con FBS al 10%. La suspensión de células se dispersó en una placa Petri de 6 cm para tener $4,5 \times 10^6$ células/3 ml/placa, y se incubó durante 2 horas en un incubador mantenido a 5% de CO_2 y 37°C . Posteriormente, se descartó el sobrenadante, se lavó la placa Petri tres veces con PBS para retirar las células no adherentes, y las células adheridas en la parte interior de la placa Petri se usaron como macrófagos. Después de preincubar los macrófagos durante 20 minutos en medio RPMI1640 con FBS al 1%, se añadió a esto zimosan opsonizado usando suero de rata, y la mezcla se cultivó en un incubador mantenido a 5% de CO_2 y 37°C durante un periodo de tiempo predeterminado. Incidentalmente, las muestras se añadieron 30 minutos antes de la adición de zimosan. Después del término del cultivo, se recuperó el sobrenadante del cultivo y se midió la cantidad de LTB_4 (leucotrieno B_4) en el sobrenadante usando un kit ELISA (kit leukotriene B_4 EIA, Cayman). Se calculó la actividad de inhibición de liberación de leucotrieno B_4 a partir de los valores medidos de leucotrieno B_4 , usando la siguiente fórmula de cálculo (2):

$$\text{Tasa de inhibición de la liberación de leucotrieno } B_4 (\%) = (1 - (S - B) / (C - B)) \times 100 \quad (2)$$

B: cantidad de leucotrieno B_4 liberado de las células de control en ausencia de inductor

C: cantidad de leucotrieno B_4 liberado de las células en presencia de inductor

S: cantidad de leucotrieno B_4 liberado de las células en presencia de muestra de ensayo e inductor

TABLA 2

Concentración de la muestra ($\mu\text{g/ml}$)	Tasa de inhibición (%)
Naringenin-chalcona (500 $\mu\text{g/ml}$)	98,2
Naringenin-chalcona (50 $\mu\text{g/ml}$)	93,5
Naringenin-chalcona (5 $\mu\text{g/ml}$)	62,3

Como queda claro a partir de los resultados mostrados en la Tabla 2, la naringenin-chalcona exhibió una actividad inhibitoria de la liberación de leucotrieno de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 4

Evaluación de la acción inhibitoria de la anafilaxia en el edema auricular de ratón

(1) La acción inhibitoria de la anafilaxia se midió según el método descrito a continuación con respecto al Extracto de Tomate 1 obtenido en el Ejemplo 1-1. Estos resultados se muestran en la Tabla 3.

Se usaron ratones hembra C3H/Hecrj, de 7 semanas, que tenían pesos corporales de 15-20 g, en grupos de cinco animales cada uno. Se suspendió el Extracto de Tomate 1 en disolución de CMC-Na (carboximetilcelulosa sódica) al 5%, mientras que se administró CMC-Na al 0,5% como control. Las muestras de administraron seis veces durante el curso de cinco días, y las mediciones se hicieron el día 5. Los animales recibieron dosis una vez al día desde el día 1 hasta el día 4, y el día 5, recibieron dosis por vía oral dos veces, 4 horas antes y 30 minutos después de la administración de una disolución de IgE anti-TNP. La dosis del Extracto de Tomate 1 fue 0,16 mg, 0,8 mg ó 4 mg por 1 kg de peso corporal de ratón.

Se administraron 0,2 ml de disolución de IgE anti-TNP (trinitrofenilo) al 1% por la vena del fondo del ojo, y 30 minutos después, se administró por vía oral la disolución de muestra. 30 minutos después, se midió el grosor de las orejas izquierda y derecha. Inmediatamente después de eso, se aplicaron a cada oreja 10 μ l de una disolución de cloruro de picrilo al 0,8% en acetona-aceite de oliva (1:1). Se midió el grosor de las orejas izquierda y derecha de los ratones dos horas después de la aplicación, y se tomó la diferencia en el grosor de las orejas antes y después de la aplicación para representar el edema causado por anafilaxia. Se llevó a cabo un ensayo de significancia usando el ensayo t de Student.

TABLA 3

Grupos	Anticuerpo IgE anti-TNP	Dosis de Extracto de Tomate (mg/kg/dosis)	Cloruro de picrilo en las orejas	Edema (mm) $\pm$ error estándar
Extracto de tomate	+	4	+	0,975 $\pm$ 0,028**
Extracto de tomate	+	0,8	+	1,175 $\pm$ 0,064*
Extracto de tomate	+	0,16	+	1,350 $\pm$ 0,049
Grupo de control sensibilizado con cloruro de picrilo	+	0	+	1,555 $\pm$ 0,113
Grupo de control sin sensibilización	-	0	+	0,142 $\pm$ 0,030

** : $p < 0,01$ (diferencia significativa del grupo de control sensibilizado con cloruro de picrilo)

* : $p < 0,05$ (diferencia significativa del grupo de control sensibilizado con cloruro de picrilo)

(2) La acción inhibitoria de la anafilaxia se midió de la misma manera que en el punto (1) mencionado anteriormente con respecto a la naringenin-chalcona obtenida en el Ejemplo 1-2. La dosis de naringenin-chalcona fue 0,0064 mg, 0,032 mg, 0,16 mg ó 0,8 mg por kilogramo de peso corporal del ratón. Los resultados se muestran en la Fig. 8.

ES 2 287 137 T3

Como queda claro a partir de los resultados mostrados en la Fig. 8, la naringenin-chalcona exhibió una acción inhibitoria de la anafilaxia de manera dependiente de la dosis. Dado que la anafilaxia es un tipo de síntoma de alergia, se indicó que la naringenin-chalcona es útil como agente antialérgico.

5 Ejemplo 5

Ensayo citotóxico

10 A 80 μ l de una suspensión de células ($1-2 \times 10^6$ células/ml) preparada de la misma manera que en el Ejemplo 2 se añadieron 20 μ l de disoluciones de muestra (naringenin-chalcona, obtenida en el Ejemplo 1-2) con diversas concentraciones, y la mezcla se cultivó a 37°C. Se tomaron alícuotas de 10 μ l cada una después de 0, 10, 20, 60 y 120 minutos desde el inicio del cultivo, y cada alícuota se añadió a 20 μ l de azul tripán al 0,4% preparado de antemano. Juzgando que las células que se tiñeron con el pigmento azul eran células muertas, se contó el número de células en un examen microscópico usando un hemocitómetro. Se midió la viabilidad (porcentaje de células viables respecto al número total de células) y el número de células viables. Como resultado, no se observó citotoxicidad.

Ejemplo 6

Medicamento que comprende el agente antialérgico de la presente invención

20 La naringenin-chalcona purificada en el Ejemplo 1-2 se preparó de la manera descrita a continuación para dar un medicamento.

25 (1) Se mezclaron 100 g de naringenin-chalcona con una cantidad igual de lactosa y 5 g de estearato de magnesio, y la mezcla se conformó en comprimidos con una máquina de hacer comprimidos de acción única, para producir comprimidos que tenían un diámetro de 10 mm y un peso de 300 mg.

(2) Los comprimidos obtenidos anteriormente en (1) se pulverizaron después, se clasificaron y se ajustaron en tamaño a través de un tamiz para obtener gránulos de 20-50 de malla.

30 Ejemplo 7

Alimentos y bebidas que comprenden el agente antialérgico de la presente invención

35 (7-1) Se preparó un caramelo con la siguiente composición (partes en peso) como alimento que comprende un agente antialérgico de la presente invención.

Azúcar (47,0), jarabe de almidón (49,76), fragancia (1,0), agua (2,0), y naringenin-chalcona (0,24).

40 (7-2) Se preparó un caramelo con la siguiente composición (partes en peso) como alimento que comprende un agente antialérgico de la presente invención.

Azúcar (47,0), jarabe de almidón (49,76), fragancia (1,0), agua (2,0), y ácido tricafeoilquínico o ácido dicafeoil-succinilquínico (0,24).

45 Ejemplo 8

Cosméticos que comprenden el agente antialérgico de la presente invención

50 (8-1) Se preparó una pasta de dientes con la siguiente composición (partes en peso).

Difosfato de calcio (42), glicerina (18), carragenina (0,9), laurilsulfato sódico (1,2), sacarina sódica (0,09), paraoxibenzoato de butilo (0,005), naringenin-chalcona (0,05), fragancia (1) y agua añadida en una cantidad tal para llevar el total a 100 partes en peso.

55 (8-2) Se preparó una loción para la piel con la siguiente composición (partes en peso).

Glicerina (5,0), propilenglicol (4,0), naringenin-chalcona (0,15), éster de monolaurato de polioxietilensorbitán (2,0), etanol (10,0), fragancia (0,1) y agua purificada añadida en una cantidad tal para llevar el total a 100 partes en peso.

60 (8-3) Se preparó un tinte para el cabello con la siguiente composición (partes en peso).

Cloruro de dimetilestearilo (1,4), alcohol bencilamonioestearílico (0,6), mono- estearato de glicerina (1,5), sal de mesa (0,1), naringenin-chalcona (0,1) y agua purificada añadida en una cantidad tal para llevar el total a 100 partes en peso.

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, se proporcionan agentes antialérgicos que comprenden, como ingrediente activo, naringenin-chalcona, y un método para producir un agente antialérgico que comprende una etapa de extraer una materia prima de tomate con un disolvente.

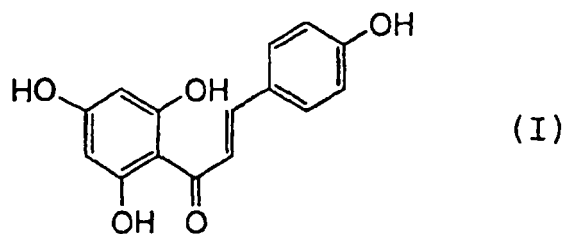
Para la materia prima de tomate a ser extraída, se puede usar pericarpio de tomate y residuo de tomate exprimido. Estos son materiales de desecho producidos en grandes cantidades en los lugares de elaboración de zumo de tomate, ketchup y similares. La presente invención es extremadamente útil también en el sentido de que estos residuos industriales pueden ser utilizados eficazmente.

Dado que los agentes antialérgicos de la presente invención exhiben una excelente actividad inhibitoria de la liberación de histamina y una excelente actividad inhibitoria de la liberación de leucotrieno, son útiles como agentes preventivos y terapéuticos, agentes antiinflamatorios, o como inhibidores de la liberación de histamina o inhibidores de la liberación de leucotrieno, para diversas enfermedades alérgicas. Además, dado que los agentes antialérgicos de la presente invención inhiben la liberación de histamina de las células grasas en las reacciones alérgicas de tipo I, son particularmente útiles en la prevención y el tratamiento de la dermatitis atópica, rinitis alérgica, polinosis o asma alérgico, etcétera, causados de este modo.

Además, la presente invención proporciona medicamentos, alimentos, bebidas y cosméticos que comprenden dichos agentes antialérgicos. Los agentes antialérgicos de la presente invención son capaces de comunicar una actividad antialérgica, actividad antiinflamatoria o actividad inhibitoria de la liberación de histamina a medicamentos, alimentos, bebidas y cosméticos al añadirlos a estos productos.

REIVINDICACIONES

1. Uso de naringenin-chalcona, representada por la siguiente fórmula (I):



en la fabricación de una composición para el tratamiento y prevención de enfermedades alérgicas.

Fig.1

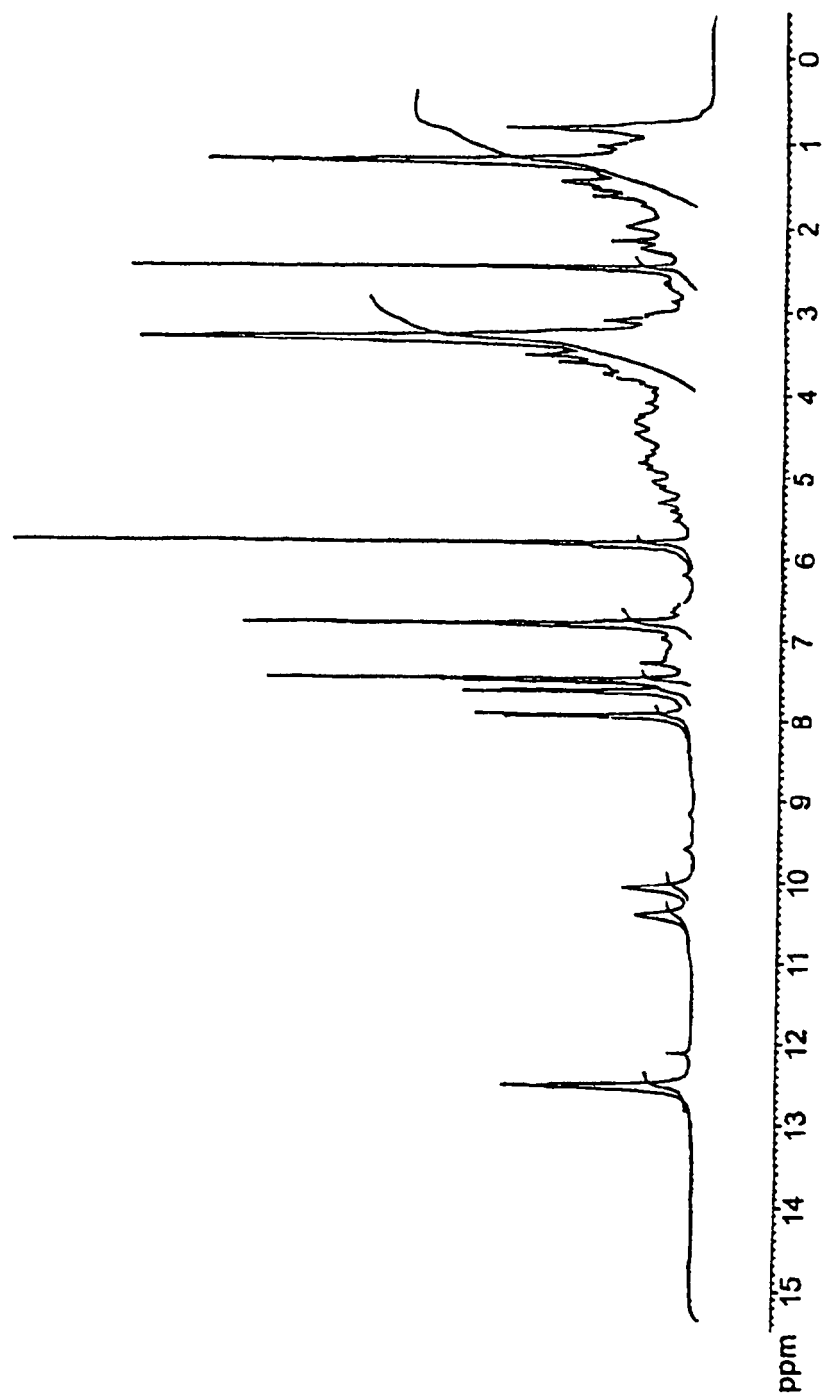


Fig. 2

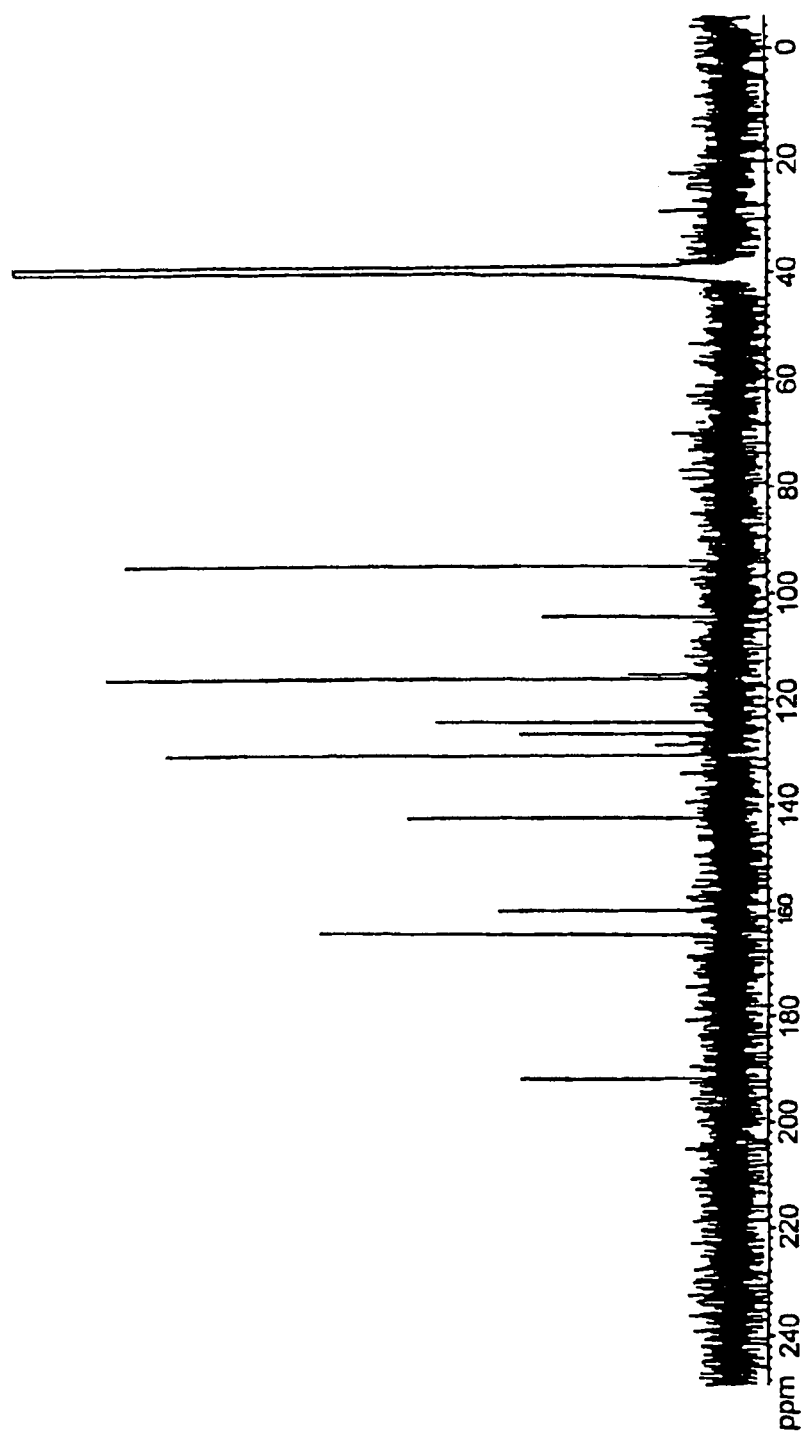


Fig. 3

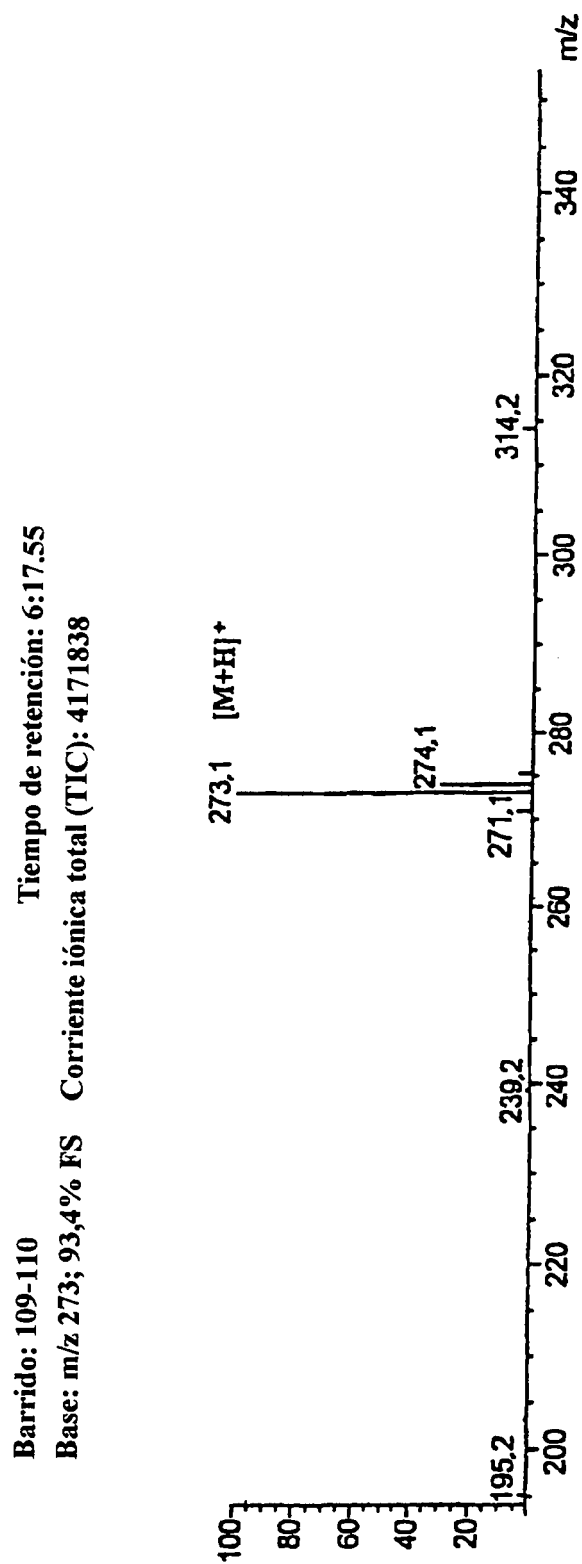


Fig.4

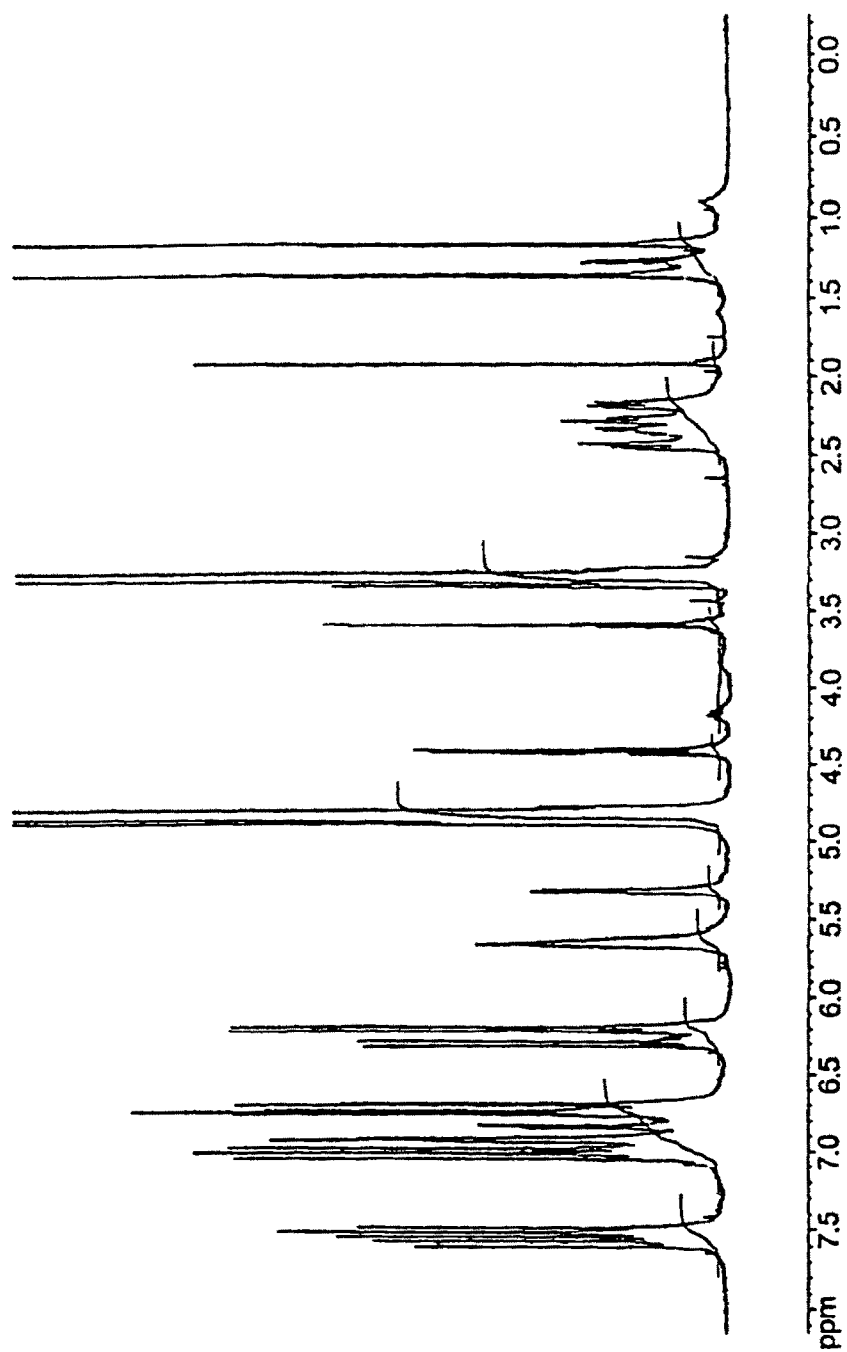


Fig. 5

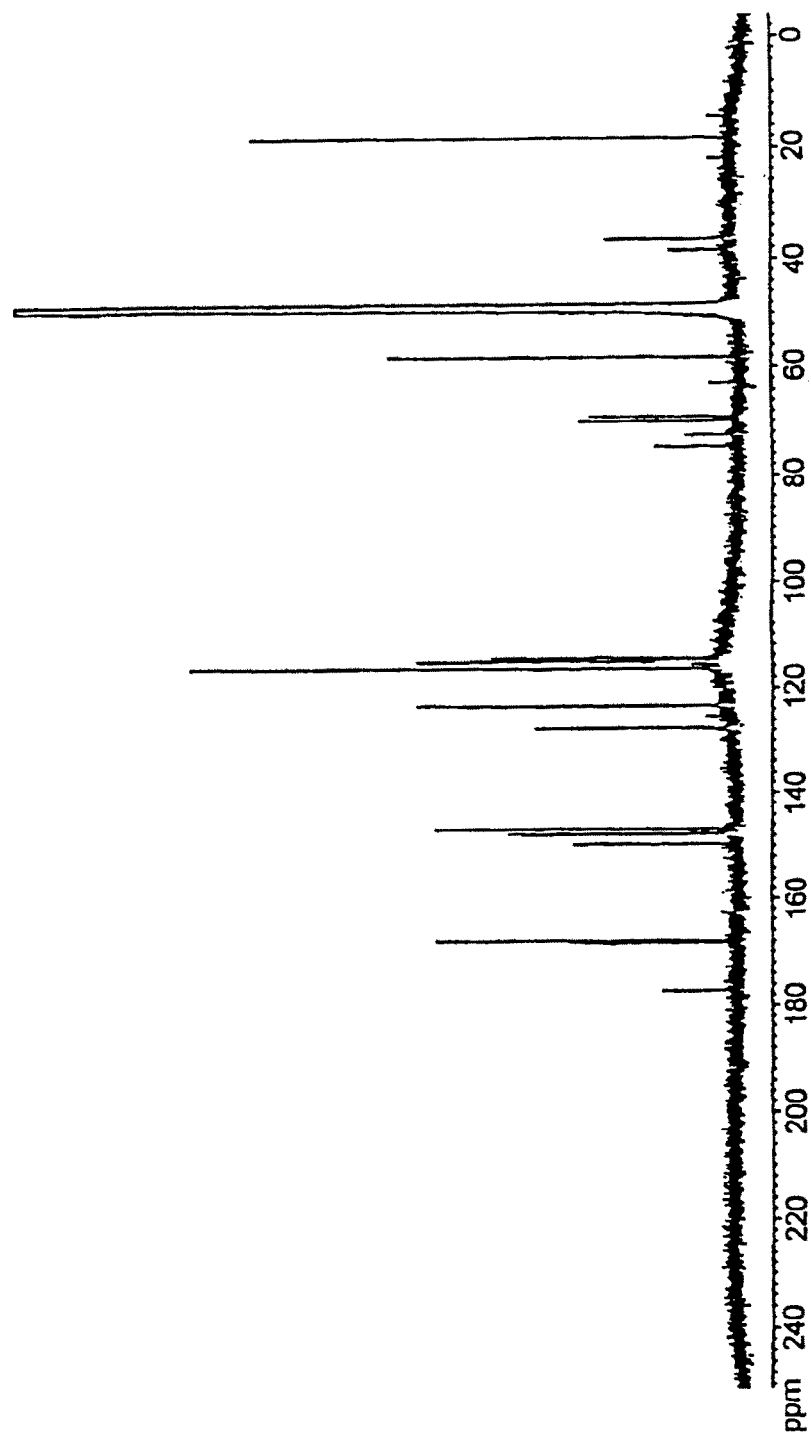


Fig. 6

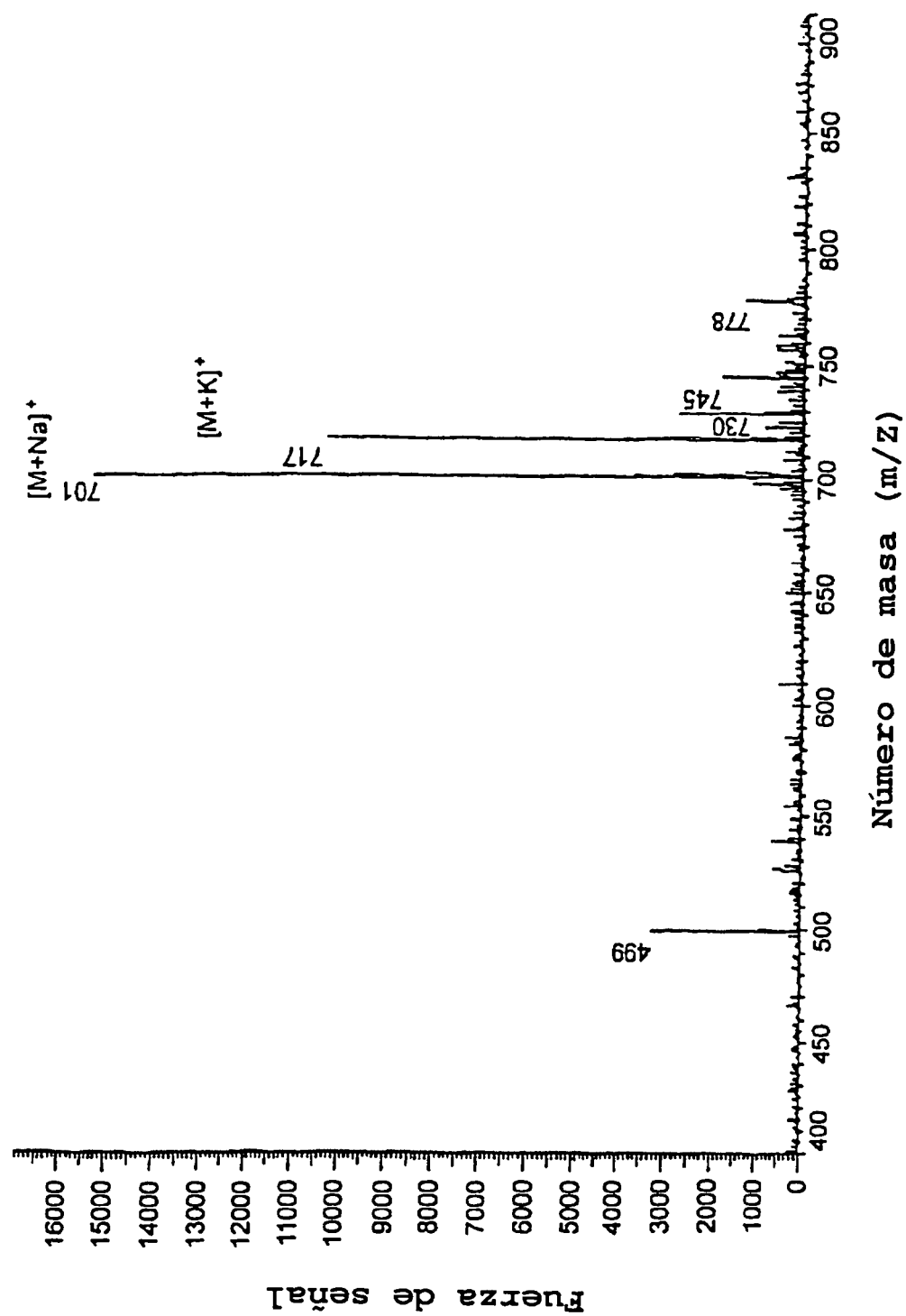


Fig.7

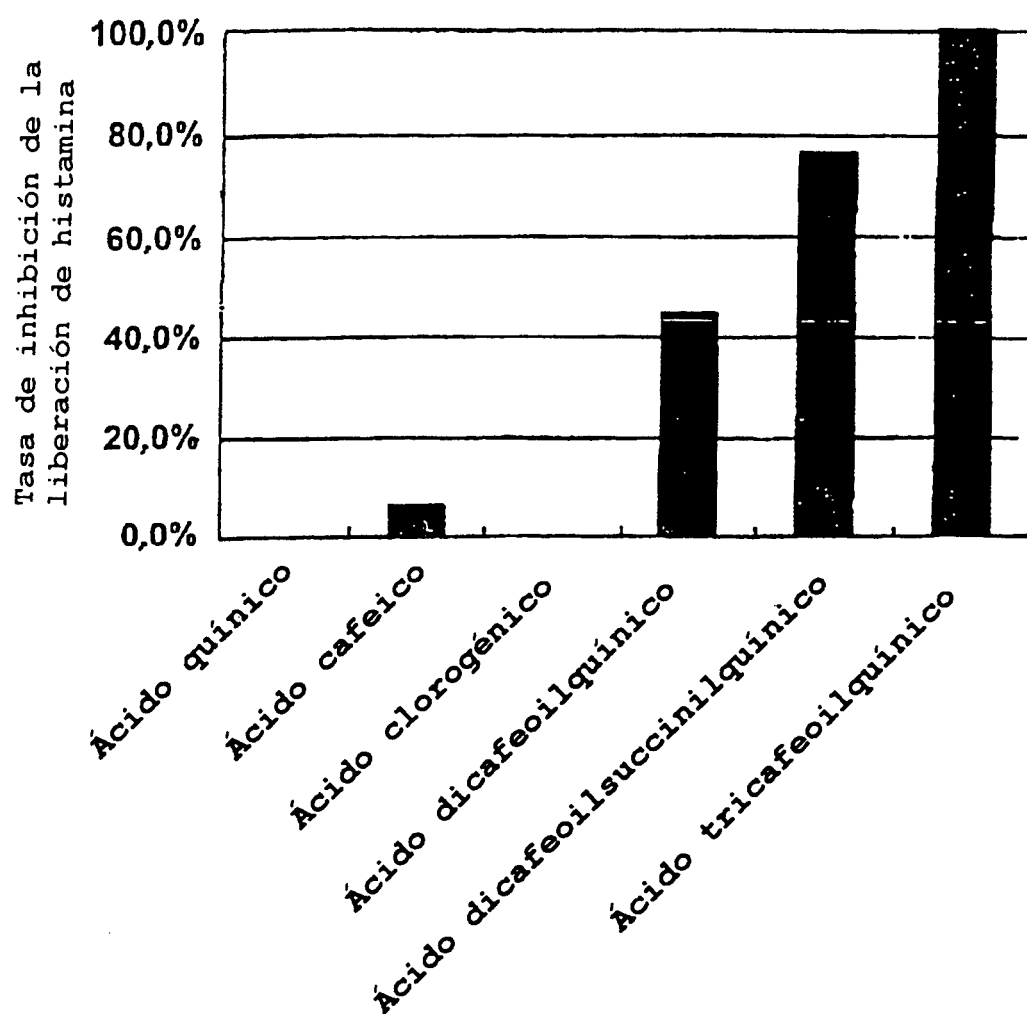


Fig. 8

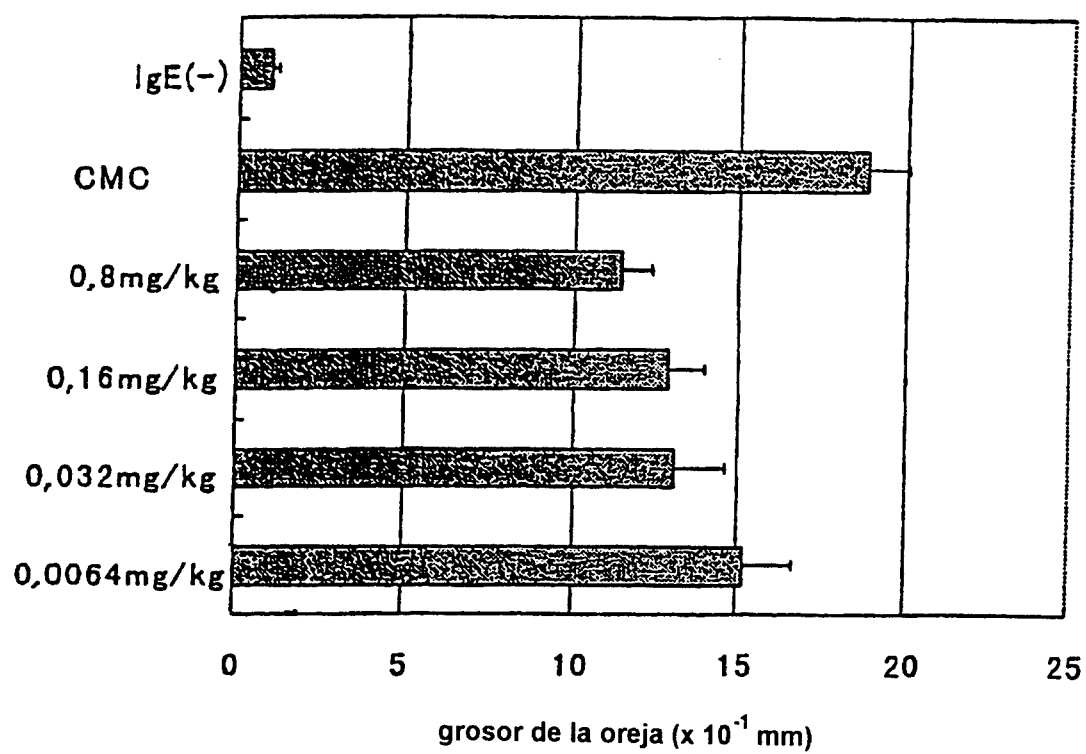


Fig.9

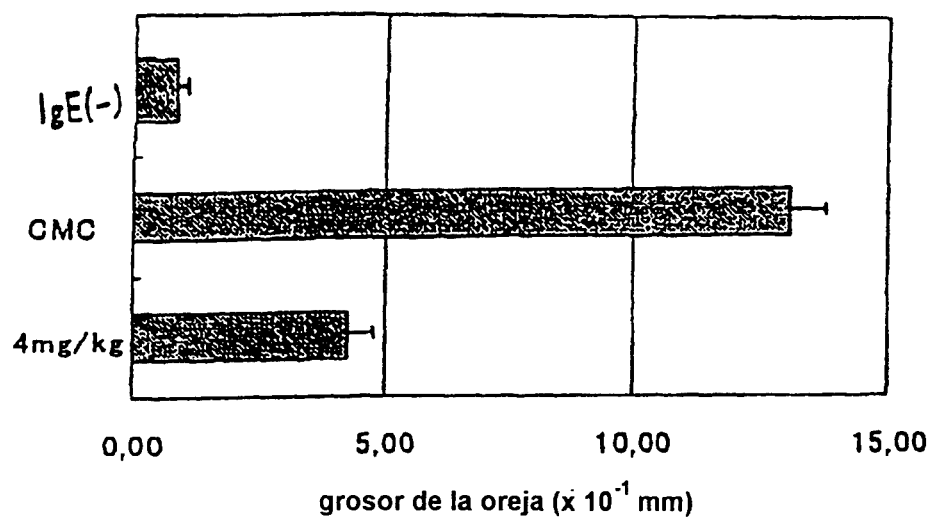


Fig.10

