



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 285 923**

⑫ Número de solicitud: 200503082

⑬ Int. Cl.:
A61K 31/201 (2006.01)
A61K 31/07 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **14.12.2005**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2007**

Fecha de la concesión: **12.09.2008**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.10.2008**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.10.2008

⑲ Titular/es: **DIETA MEDITERRÁNEA ACEITES Y
VINAGRES, S.A.**
Avda. de la Raza, Manzana nº 1
41012 Sevilla, ES

⑳ Inventor/es: **Medina Montaña, José**

㉑ Agente: **Isern Jara, Nuria**

㉒ Título: **Producto para su utilización en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades inflamatorias crónicas.**

㉓ Resumen:

Producto para su utilización en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades inflamatorias crónicas.

Producto que contiene, como mínimo, ácido oleico y licopeno junto con antioxidantes de origen natural, tales como β -carotenos, retinol, fitoesteroles, tirosol y ácidos grasos, administrado por vía oral e indicado especialmente en la prevención de la enfermedad cardiovascular, y en aquellas patologías mediadas por una activación anómala del factor NF- κ B como son las enfermedades crónicas y algunos tipos de cánceres como el de colon y el de próstata.

ES 2 285 923 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Producto para su utilización en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades inflamatorias crónicas.

La presente invención se refiere a un nuevo producto que contiene ácido oleico y licopeno que es útil para la prevención y el tratamiento del cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades inflamatorias crónicas.

Antecedentes

Durante los últimos años se han identificado los mecanismos celulares y moleculares que regulan los procesos inflamatorios que tienen lugar durante la ateromatosis, la arteriosclerosis y la enfermedad cardiovascular. El desencadenante de la alteración estructural y funcional de la pared arterial es la concentración de LDL oxidada en el plasma y en la propia pared arterial. Está demostrado que la forma de LDL oxidada es más importante en la enfermedad cardiovascular que los niveles absolutos de colesterol total, colesterol-HDL y colesterol-LDL. Esto es debido a la forma de actuar de LDL oxidada que es un activador del proceso inflamatorio cardiovascular.

En primer lugar, la LDL oxidada induce una alteración endotelial que consiste principalmente en la interrupción en el proceso de producción de óxido nítrico (NO) que daña a las células endoteliales iniciándose un proceso en el cual se va perdiendo el tono vascular y además estas células comienzan a expresar moléculas de adhesión en su superficie que atraen a los monocitos de la sangre al foco vascular dañado. Estos monocitos migran al interior de la pared vascular fagocitando partículas de colesterol-LDL oxidado, activándose y transformándose en lo que conocemos como “células espumosas”. La acumulación de estas células espumosas (placa aterogénica) es verdaderamente dañina para la pared vascular por varios motivos, 1) se pierde el tono vascular, 2) se produce una alteración en el flujo sanguíneo que favorece los procesos trombóticos locales, 3) las células espumosas producen citoquinas inflamatorias (fundamentalmente Interleuquina 1 y Factor de necrosis tumoral, TNF α) que regulan el proceso de inflamación local, y 4) estas células espumosas producen una serie de enzimas conocidas como metaloproteinasas que destruyen la matriz extracelular del tejido conectivo, y al disminuir la cantidad de colágeno, hacen la placa de ateroma más frágil, por lo que la inflamación arterial, además, facilita la rotura de la placa, y consiguientemente, la aparición de clínica isquémica. Una gran parte de todos estos procesos esta regulada por la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B). (Véase Libby, Ridker, Maseri. *Inflammation and Atherosclerosis*. Circulation. (2002);105:1135-1143, Zapolska-Downar. *Mononuclear Cell Recruitment and Inflammation in Atherosclerosis*. Vascular disease prevention. (2004); 1, 41-51).

El término NF- κ B engloba una familia de factores de transcripción ampliamente expresados que, en mamíferos, está constituida por 5 miembros: p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105) y NF- κ B2 (p52 y su precursor p100). La ruta de NF- κ B se activa por una gran variedad de estímulos inflamatorios que pueden ser inhibidos mediante nutracéuticos (término referido en la presente invención como componentes de los alimentos que aportan un beneficio añadido para la salud), validando así el uso de los mismos en la prevención no sólo de la enfermedad cardiovascular sino también en los procesos inflamatorios crónicos que acompañan a la malignidad de ciertos cánceres humanos (por ejemplo, de colon y próstata). Véase (Siebenlist, Brown, Claudio. *Control of lymphocyte development by Nuclear Factor- κ B*. Nature Reviews. (2005); 5, 435-445, Kumar, Takada, Boriek, Aggarwal. *Nuclear factor- κ B: its role in health and disease*. Journal of Molecular Medicine. (2004); 82:434-448).

Tanto el aceite de oliva como el tomate han demostrado ser dos alimentos de extraordinario valor como alimentos funcionales y, por lo tanto, beneficiosos para la salud. Estos beneficios para la salud son debidos a las diversas actividades biológicas claramente demostradas para la mayoría de los compuestos presentes en ambos alimentos.

El extracto de tomate es rico en licopeno, fitoeno, fitoflueno, β -caroteno, tocoferoles y otros productos fitoquímicos bioactivos. El licopeno, fitoeno, fitoflueno y β -caroteno son carotenoides presentes en la dieta y se encuentran de manera habitual en el suero humano. La vitamina E en el tomate se halla como una mezcla de α , β , γ y Δ tocoferoles. Los carotenoides son pigmentos naturales que contribuyen a las pigmentaciones amarillas, naranjas y rojas de los tejidos vegetales, que son sintetizados únicamente por plantas, hongos, bacterias y algas y, por lo tanto, deben de ser incorporados en la dieta.

Un gran número de estudios epidemiológicos han sugerido una asociación entre el alto consumo de vegetales y frutas ricas en carotenoides y una reducción del riesgo de sufrir cáncer. El principal órgano que se ha relacionado con el consumo de licopeno es la próstata. Se han desarrollado diversos estudios clínicos en los que se investiga sobre el efecto del licopeno en varones. Tras una dieta rica en este caroteno, se observa un incremento de dicho compuesto en el plasma de los sujetos. Existen pruebas de que este incremento en las concentraciones de licopeno en el suero y en los tejidos, se relaciona con un descenso del estrés oxidativo y del daño al ADN provocado en células de la próstata. Una medida clínica de la posibilidad de sufrir cáncer de próstata consiste en la medida de la concentración de una enzima concreta, la fosfatasa alcalina, en sangre. Sujetos a los que se administran ingestas elevadas de tomate sufren un descenso en los niveles sanguíneos de dicha enzima. Normalmente niveles bajos de fosfatasa alcalina indican un mejor estado de salud del tejido prostático. En varios estudios clínicos se demuestra una menor incidencia de cáncer de próstata en individuos alimentados con mayores dosis de licopeno y que, gracias a ello, presentaban mayores niveles de licopeno en el plasma. El mayor efecto del licopeno fue observado en hombres que consumían frecuentemente productos derivados del tomate cocinados, tales como la salsa de tomate con aceite. En un análisis de niveles de antioxidantes en el plasma, únicamente el licopeno fue el compuesto que parecía tener una asociación significativa y

consistente con la prevención del cáncer de próstata. Véase Wertz, Siler, Goralczyk. *Lycopene: modes of action to promote prostate health*. Archives of biochemistry and biophysics. (2004); 430(1):127-34, Weisburger. *Lycopene and tomato products in health promotion*. Experimental biological medicine. (2002); 227:924-927, Campbell, Canene-Adams, Lindshield, Boileau, Clinton, Erdman. *Tomato phytochemicals and prostate cancer risk*. Journal of Nutrition. (2004); 134: 3486S-3492S, Giovanucci. *A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer*. Experimental Biological Medicine. (2002); 227:852-859.

Además de los efectos anticancerígenos del licopeno a los que acabamos de hacer referencia, se han descrito otros efectos biológicos mediados por este compuesto. Se ha demostrado que el consumo de licopeno se asocia también con una menor incidencia de enfermedad cardiovascular. Concretamente, algunos científicos han estudiado la asociación del licopeno y otros carotenoides con las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales juegan un papel muy importante en el desarrollo de aterosclerosis. También se ha demostrado que el licopeno inhibe la activación del factor NF- κ B. Véase (Sesso, Buring, Norkus, Gaziano. *Plasma lycopene, other carotenoids, and retinol and the risk of cardiovascular disease in women*. American Journal of Clinical Nutrition. (2004); 79:47-53, Panasenkov, Sharov, Briviba, Sies. *Interaction of peroxynitrite with carotenoids in human low density proteins*. Archives of biochemistry and biophysics. (2000); 373: 302-305, Kim, Kim, Ahn, Lee, Moon, Lee, Park. *Lycopene suppresses the lipopolysaccharide-induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B*. Immunology. (2004); 113 203-211).

El consumo de aceite de oliva, especialmente en su calidad “virgen extra” aporta a nuestra salud una serie de ventajas biosaludables, hasta el punto de convertirla en la grasa vegetal más beneficiosa para la salud humana, de acuerdo con numerosos estudios científicos.

El aceite de oliva tiene un elevado contenido en grasas monoinsaturadas, que en un consumo habitual contribuyen a la disminución de la concentración de colesterol en la sangre. Además de los ácidos grasos, el aceite de oliva consta de una fracción insaponificable. Se trata de un grupo muy heterogéneo de sustancias presentes en baja concentración, y entre las que se incluyen carotenos, escualeno y otros hidrocarburos, tocoferoles, fitoesteroles, polifenoles y numerosos compuestos que contribuyen a conferir al aceite su color, sabor y aroma característicos. Estos componentes desarrollan importantes actividades biológicas, ya que muchos de ellos actúan como vitaminas y antioxidantes naturales y pueden tener efectos en la disminución del colesterol, antiaterogénicos y antiinflamatorios. En este sentido, es destacable el contenido en vitamina E del aceite de oliva virgen extra, ya que un consumo moderado de aceite cubre la mayor parte de las recomendaciones dietéticas de esta vitamina. Véanse (Welters, Tadayyon, Scarpello, Smith, Morgan. *Mono-unsaturated fatty acids protect against β -cell apoptosis induced by saturated fatty acids, serum withdrawal or cytokine exposure*. FEBS letters. (2004); 560: 103-108, Beauchamp, Keast, More, Lin, Pika, Han, Lee, Smith, Breslin. *Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil*. Nature. (2005); 437: 45-46, Kris-Etherton, Pearson, Hargrove, Wan, Moriarty, Fishell, Etherton. *High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations*. American Journal of Clinical Nutrition. (1999); 70:1009-15, Owen, Haubner, Würtele, Hull, Spiegelhalder, Bartsch. *Olives and olive oil in cancer prevention*. European Journal of Cancer Prevention. (2004); 13:319-326, Panagiotakos, Pitsavos, Polychronopoulos, Chrysoshoou, Zampelas, Trichopoulos. *Can a Mediterranean diet moderate the development and clinical progression of coronary heart disease? A systematic review*. Medical Science Monitor. (2004); 10(8): RA193-198).

Los efectos en la concentración y en la composición de las grasas en la dieta y la toma de colesterol en el desarrollo de la enfermedad coronaria cardiovascular son la base de la hipótesis lipídica de la aterosclerosis. Por lo tanto, la composición de la dieta no se relaciona únicamente con la concentración de lípidos y lipoproteínas circulantes, sino también con la incidencia y la prevalencia de la enfermedad cardiovascular en la población. La clase y la densidad de las LDL, en combinación con la genética y la dieta de cada individuo, debe de jugar un importante papel en el riesgo de que un sujeto sufra enfermedad coronaria. Otra propiedad ventajosa de los ácidos grasos monoinsaturados es su poder contra la oxidación de las lipoproteínas LDL, hecho demostrado ampliamente. La oxidación de las LDL es probablemente un factor importante en la aterogénesis, ya que las partículas LDL oxidadas no pueden ser reconocidas por el receptor LDL y, entonces, se asocian a unos receptores de macrófagos, de modo que estos acumulan el colesterol llevando a la formación de células espumosas y de secciones de grasa. Estos sucesos provocan el desarrollo de la aterosclerosis. Los ácidos grasos monoinsaturados, gracias a su estructura química, son muchos más estables y menos propensos a la peroxidación lipídica que los ácidos grasos poliinsaturados (más inestables). Es decir, una alta ingesta de ácidos grasos monoinsaturados nos lleva a un aumento de la concentración de estos ácidos grasos en las partículas LDL. Esto nos lleva a una menor susceptibilidad de estas partículas a las modificaciones por oxidación *in vitro*, cuando lo comparamos con partículas de LDL que contienen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (consecuencia de una dieta rica en estos ácidos grasos). Véase (Wahrburg. *What are the health effects of fat?* European Journal of Nutrition. (2004); 43 : I/6-I/11, Monserrat Fitó Colomer. *Efectos antioxidantes del aceite de oliva y de sus compuestos fenólicos*. 2003. Tesis Doctoral).

Las olivas y el aceite de oliva contienen altas concentraciones de antioxidantes fenólicos, de escualeno y de vitamina E. Algunos estudios han demostrado la relación entre el consumo de alimentos ricos en vitamina E y una menor mortalidad por enfermedad cardiovascular.

El hidroxitirosol forma parte de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Se ha observado su ingestión por parte del organismo, lo que es imprescindible para demostrar su actividad. Este compuesto presenta una fuerte actividad antioxidante, que defiende a las LDL de ser oxidadas. Esta actividad antioxidante es incluso mayor que la de tocoferoles

o carotenos. Véase (Tuck, Hayball. *Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects*. Journal of Nutritional Biochemistry. (2002); 13(11):636-644, Visioli, Poli, Galli. *Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil*. Medicinal Research Reviews. (2002); 22(1):65-75, Mateos, Domínguez, Espartero, Cert. *Antioxidant effect of phenolic compounds, α -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2003); 51(24):7170-5, Puerta, Domínguez, Gutiérrez, Flavill, Hoult. *Effects of virgin olive phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon synergic neurotransmission*. Life Sciences. (2001); 69(10):1213-22, Rune, Blomhoff. *Dietary antioxidants and cardiovascular disease*. Current Opinion in Lipidology. (2005); 16(1):47-54).

A diferencia de los productos conocidos ya en la técnica, la presente invención proporciona un producto que comprende, principalmente, ácido oleico y licopeno, junto con otros antioxidantes naturales, y que presenta las siguientes ventajas: (a) por su capacidad antioxidante, puede regular la oxidación de las LDL que provocan el desarrollo de la enfermedad cardiovascular; (b) debido a la presencia de compuestos inhibidores del factor de transcripción NF- κ B, puede regular fenómenos inflamatorios, los cuales se relacionan con la aparición y desarrollo de diversas patologías crónicas como la enfermedad cardiovascular, la artritis reumatoide, y la inflamación asociada a tumores; (c) gracias a que contiene compuestos potencialmente anticancerígenos, puede impedir, disminuir o retrasar el riesgo de cáncer de diversas etiologías; (d) debido a la presencia de antioxidantes naturales se produce un efecto sinérgico; (e) es fácil de preparar y (f) tiene un sabor agradable para el paladar. Dichas ventajas se pueden encontrar individualizadas en diferentes productos, pero no existe un producto como tal que englobe todas estas características.

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un nuevo nutracéutico que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de ácido oleico (ácido graso monoinsaturado con propiedades reguladoras de la respuesta inflamatoria) y licopeno (carotenoide con actividad preventiva de la enfermedad cardiovascular), que se emplean junto con cantidades adecuadas de uno o varios de los siguientes compuestos: (a) β -caroteno (principalmente procedente del tomate y del aceite de oliva y precursor de la Vitamina A con una importante capacidad antioxidante) y/o una cantidad equimolar de sus derivados, preferiblemente, tales como retinol (vitamina A) y derivados del mismo; (b) retinol (principalmente procedente del tomate y del aceite de oliva) y todos sus derivados por acción (bio)química, preferiblemente, sus isómeros retinol todo-trans y 11-cis retinol, los productos de oxidación ácido retinoico todo-trans, ácido 13-cis retinoico, ácido 9-cis retinoico y el producto de reducción 11-cis retinal, junto con todos los derivados del mismo; (c) ácidos grasos libres (principalmente procedentes del aceite de oliva y actúan como reguladores del metabolismo de las LDL) tales como el ácido linoleico, linolénico, palmítico, esteárico, araquidónico, palmitoleico, gadoleico y behénico, así como los derivados por (de)saturación de los mismos, preferiblemente ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico, araquidónico; (d) fitoesteres (compuestos pertenecientes a la fracción insaponificable del aceite de oliva que combinan un amplio rango de actividades biológicas antioxidantes, anticancerígenos y antiaterogénicas), tales como β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, cicloartenol, sitostanol, campestanol, preferiblemente β -sitosterol, o concentraciones equimolares de sus derivados (conjugados de ácidos grasos libres formando ésteres) y sus productos de saturación, tales como los tocoferoles (pueden actuar reduciendo el riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular) junto con sus isómeros α -vitamina E-, β y γ , y otros tocotrienoles; (e) tirosol (ácido fenilacético derivado de la tirosina ([2-(4-hidroxifenil)etanol]) perteneciente a la fracción insaponificable del aceite de oliva) y sus derivados procedentes de la hidrogenación, tales como el hidroxitirosol [2-(3,4-dihidroxifenil)etanol].

La adición de estos antioxidantes naturales a la mezcla inicial compuesta por licopeno y ácido oleico proporciona un efecto que puede sumarse a la actividad antioxidante que se proporcionaría si actuasen cada uno de manera individual.

En una realización preferente de la presente invención se proporciona una composición, preparada mediante mezcla y homogeneización, que se administra de forma oral y que en un volumen de 20 ml contiene:

- Ácido Oleico en una cantidad que varía entre 1 y 15 g.
- Licopeno en una cantidad que varía entre 1 y 125 mg.
- β -caroteno en una cantidad que varía entre 0,1 y 10 mg.
- Ácido linoleico en una cantidad que varía entre 0,1 y 10 g.
- Ácido palmitoleico en una cantidad que varía entre 0,01 y 2 g.
- Fitoesteres en una cantidad que varía entre 1 y 100 mg.
- α -Tocoferol (vitamina-E) en una cantidad que varía entre 0,1 y 10 mg.
- Derivado de tirosol, preferiblemente el tirosol-hidroxitirosol en una cantidad entre 0,01 y 1 mg.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización del presente compuesto como:

(a) antioxidante, ya que puede regular la oxidación de las LDL que provocan el desarrollo de la enfermedad cardiovascular;

(b) regulador de procesos inflamatorios debido a la presencia de compuestos inhibidores del factor de transcripción NF- κ B, donde dichos procesos se relacionan con la aparición y el desarrollo de diversas patologías crónicas tales como la enfermedad cardiovascular, la artritis reumatoide, y la inflamación asociada a tumores;

(c) potencialmente anticancerígeno, ya que puede impedir, disminuir o retrasar el riesgo de cáncer de diversas etiologías;

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no son limitativos e ilustran la invención para una composición de extracto de tomate, aceite de oliva y una mezcla de aceite de oliva y extracto de tomate.

Ejemplo 1

Inhibición de la activación del factor de transcripción kappa B (NF- κ B) inducida por TNF α con un extracto de tomate que contiene un mínimo de 6% de licopeno en células linfoides

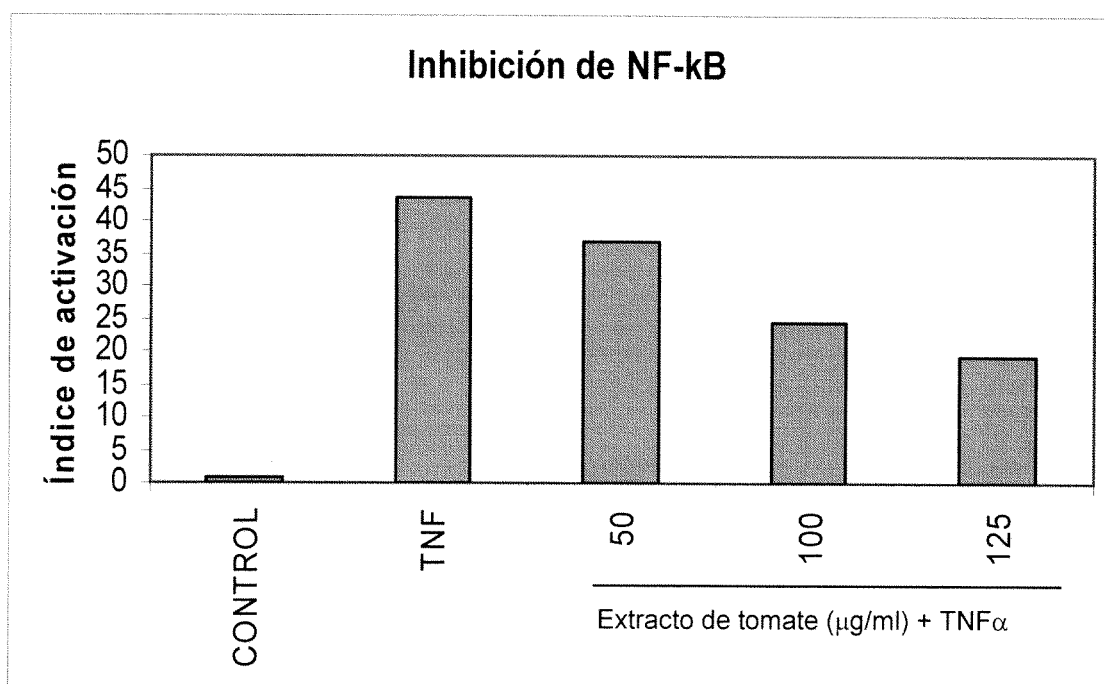
Método

Células. Una línea celular 5.1, que es un clon derivado de Jurkat transfectado establemente con un plásmido que contiene el gen de la luciferasa dirigido por el promotor HIV-LTR, se mantuvo en crecimiento exponencial en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 2 mM de L-glutamina, 1 mM HEPES, antibióticos y 200 μ g/ml de G418.

Ensayo de luciferasa. La línea celular 5.1 se preincubó durante 30 minutos con extracto de tomate que tenía un contenido mínimo en licopeno del 6%, seguido de una estimulación con TNF α (2 ng/ml) durante 6 horas. A continuación, las células se lisaron en 25 mM tris-fosfato pH 7,8, 8 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, y 7% glicerol. La actividad luciferasa se midió empleando un Autolumat LB 9501 atendiendo a las instrucciones del kit de ensayo de luciferasa y la concentración de proteínas se midió mediante el método Bradford. Para eliminar el ruido de fondo provocado por la solución de lisis, este valor fue sustraído en cada valor del experimento y se expresó la activación como una inducción proporcional con respecto a células sin tratar.

Composición del extracto: El extracto de tomate empleado para el ensayo contiene principalmente: licopeno (6%), fitoeno (0,6%), fitoflueno (0,5%), β -caroteno (0,2%), tocoferoles (2%), fitoesteroles (0,6%).

Resultado



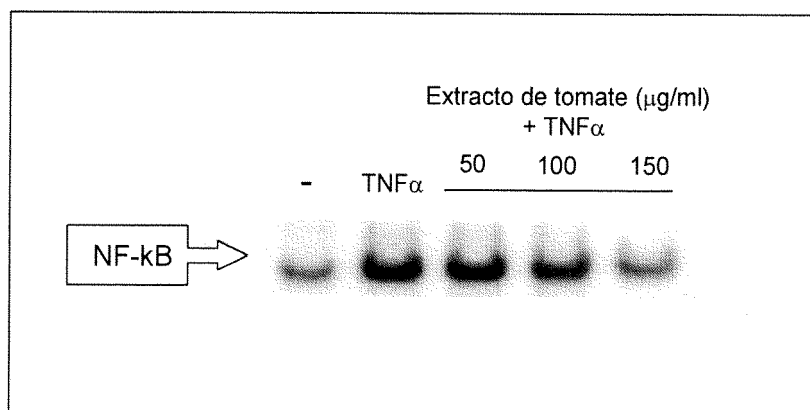
Ejemplo 2

Inhibición de la unión al ADN de NF- κ B por TNF α con extracto de tomate que contiene un mínimo de 6% de licopeno en células linfoides

Método

Ensayo de retardo en gel. Aislamiento de proteínas y ensayo de movilidad electroforética (EMSA). Se estimularon las células 5.1 (10^6 /ml) en un medio completo indicado anteriormente con extracto de tomate con un contenido mínimo en licopeno del 6%. A continuación, se lavaron las células dos veces con tampón fosfato salino frío, se aislaron las proteínas de los extractos nucleares y se determinó la concentración de proteínas mediante el método Bradford (Bio-rad). Para el ensayo de movilidad electroforética (EMSA) la sonda consenso de NF- κ B 5'-AGTTGAGGGGACTTTCC-CAGG-3' se marcó en la cola con [γ - 32 P]ATP. La mezcla para la reacción de unión contenía 3 μ g de extracto proteico, 0,5 μ g de poly(dI-dC), 20 mM HEPES, pH 7,70 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,01% NP-40, 100 μ g/ml BSA, 4% Ficoll, y 100.000 cpm de fragmentos de ADN marcados en la cola en un volumen total de 20 μ l. Después de 30 minutos de incubación a 4°C, la mezcla se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% que contenía 89 mM Tris-borato, 89 mM ácido bórico, y 1 mM EDTA. Los geles se sometieron previamente a electroforesis a 225V durante 30 minutos y, a continuación, durante 2 horas tras la carga de las muestras. Estos geles se secaron y se expusieron a una película de rayos X a -80°C.

Resultado



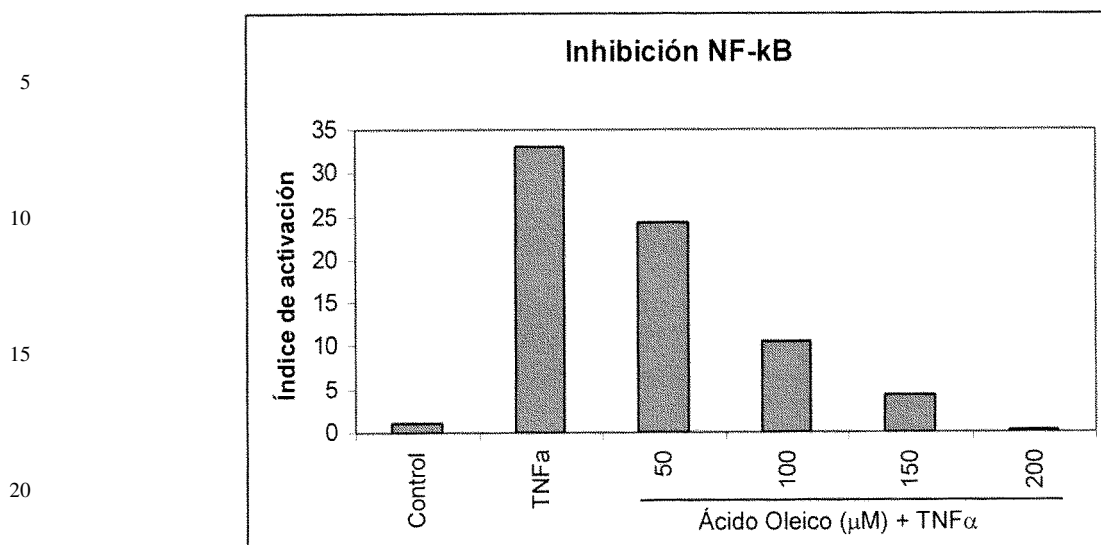
Ejemplo 3

Inhibición de la activación de NF- κ B por TNF α con ácido oleico en células linfoides

Método

Células. Se utilizó una línea celular 5.1, tal como la descrita en el ejemplo 1.

Ensayo de luciferasa. La línea celular 5.1 se preincubó durante 30 minutos con ácido oleico en las concentraciones indicadas, seguido de una estimulación con TNF α (2 ng/ml) durante 6 horas. La actividad transcripcional de NF- κ B se midió de la misma manera que en el ejemplo 1.

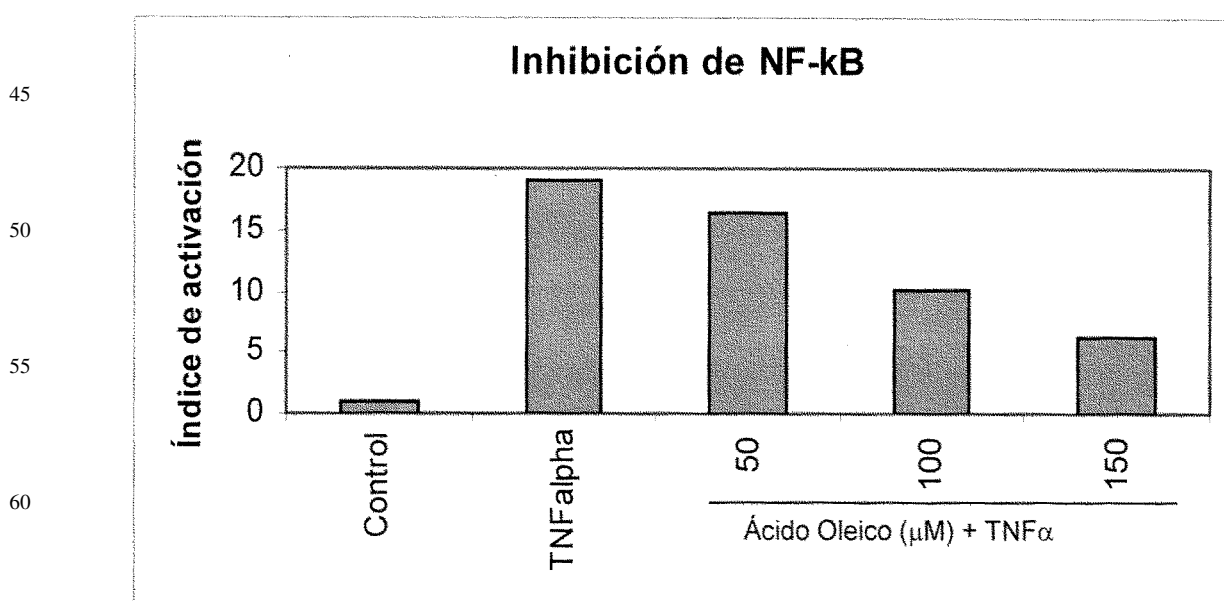
Resultado*Ejemplo 4*

Inhibición de la activación de NF-κB por TNFα mediante el ácido oleico en células de cáncer de pulmón

Método

Células. La línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón se mantuvo en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's*), complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor.

Transfecciones transitorias y ensayo de luciferasa. Las células A549 (10^5 /ml) se transfectaron con el gen reportero LTR-Luc y con el KBF-Luc. Las transfecciones se llevaron a cabo empleando el agente de transfección LipofectA-MINE PLUS, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, durante 24 horas. Después de la incubación con ácido oleico durante 30 minutos, se estimularon las células transfectadas durante 6 horas con TNFα (2 ng/ml). La actividad transcripcional de NF-κB se midió de la misma manera que en el ejemplo 1.

Resultado

Ejemplo 5

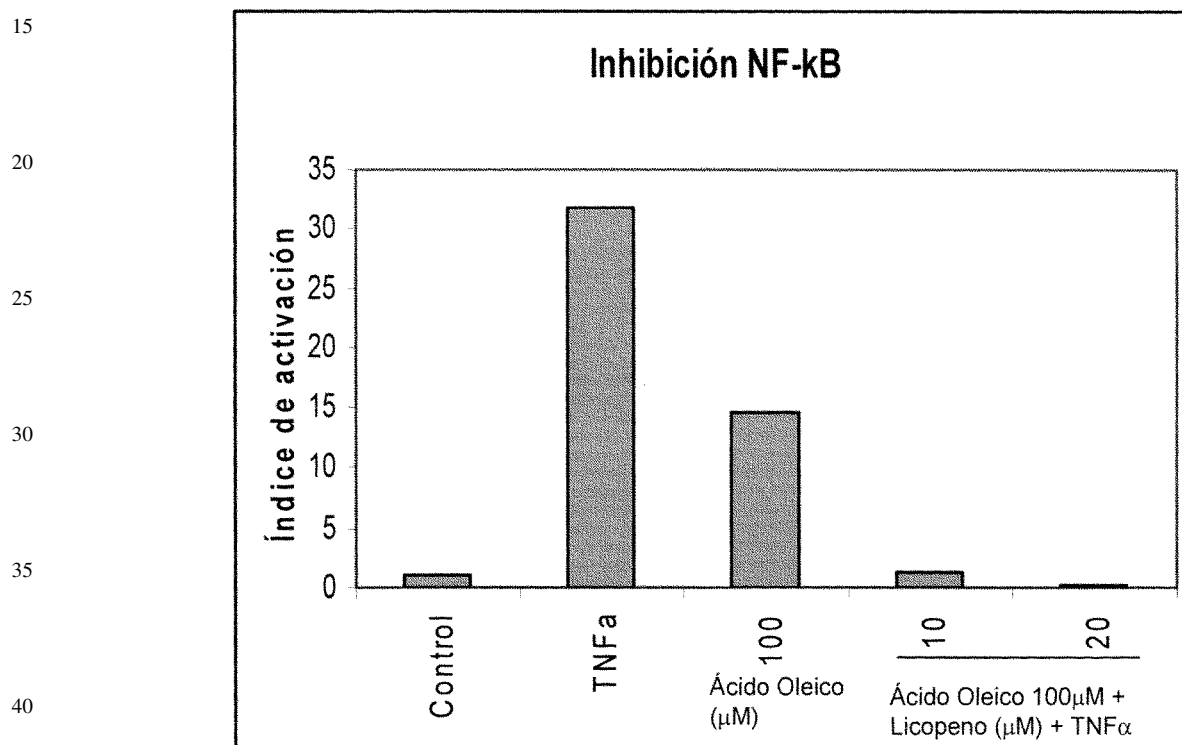
Inhibición de la activación de NF- κ B por TNF α mediante la combinación de ácido oleico y licopeno

5 Método

Células. Se utilizó una línea celular 5.1, tal como la descrita en el ejemplo 1.

10 *Ensayo de luciferasa.* Se preincubó la línea celular 5.1 durante 30 minutos con ácido oleico en presencia de licopeno, seguido de una estimulación con TNF α (2 ng/ml) durante 6 horas. La actividad transcripcional de NF- κ B se midió de la misma manera que en el ejemplo 1.

Resultado



45 A la vista de los resultados se puede observar que tanto el licopeno del extracto de tomate como el ácido oleico del aceite de oliva ofrecen resultados óptimos por separado en la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- κ B, concretamente, en el ejemplo 1 con extracto de tomate para células linfoides, el índice de activación disminuye hasta, aproximadamente, 25 cuando la concentración aumenta hasta 125 μ g/ml, mientras que en el ejemplo 3 con ácido oleico de la misma concentración para células linfoides, el índice de activación disminuye hasta, aproximadamente, 7-8.

50 En el ejemplo 2, se observa una menor cantidad de NF- κ B unida al ADN al aumentar la concentración del extracto de tomate.

En el ejemplo 4, se observa un efecto similar al ejemplo 3 aunque en este caso se actúa sobre células cancerígenas.

55 Finalmente, el ejemplo 5 utiliza una mezcla de ácido oleico y licopeno variando la concentración de licopeno (10 μ M y 20 μ M). Se observa claramente que existe un efecto sinérgico ya que el índice de activación disminuye hasta valores por debajo de 5. Además, cuanto mayor es la concentración de licopeno más bajo es éste índice.

60 En conclusión, es evidente que la combinación de ambos componentes (licopeno y ácido oleico) produce un mayor efecto sobre la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- κ B, el cual está implicado en los procesos relacionados con la aparición y el desarrollo de diversas patologías crónicas, tales como la enfermedad cardiovascular, la artritis reumatoide, y la inflamación asociada a tumores.

65

REIVINDICACIONES

1. Producto que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de licopeno y una cantidad terapéuticamente efectiva de ácido oleico y cantidades adecuadas de uno o varios de los siguientes compuestos:

(a) *β-caroteno* y/o una cantidad equimolar de sus derivados, tales como retinol (vitamina A) y derivados del mismo;

(b) *retinol* y todos sus derivados por acción (bio)química, preferiblemente, sus isómeros retinol todo-trans y 11-cis retinol, los productos de oxidación ácido retinoico todo-trans, ácido 13-cis retinoico, ácido 9-cis retinoico y el producto de reducción 11-cis retinal, junto con todos los derivados del mismo;

(c) *ácidos grasos libres*, tales como el ácido linoleico, linolénico, palmítico, esteárico, araquidónico, palmitoleico, gadoleico y behénico, así como los derivados por (de)saturación de los mismos, preferiblemente, ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico, araquidónico;

(d) *fitoesteroles*, tales como *β*-sitosterol, campesterol, estigmasterol, cicloartenol, sitostanol, campestanol, preferiblemente *β*-sitosterol, o concentraciones equimolares de sus derivados (conjugados de ácidos grasos libres formando ésteres) y sus productos de saturación, tales como los tocoferoles junto con sus isómeros *α*-vitamina E-, *β* y *γ*, y otros tocotrienoles;

(e) *tirosol* y sus derivados procedentes de la hidrogenación, tales como el hidroxitirosol [2-(3,4-dihidroxifenil) etanol].

2. Producto, según la reivindicación 1, que comprende, preferiblemente: ácido oleico (1-15 g), ácido palmitoleico (0,01-2 g), licopeno (1-125 mg), *β*-caroteno (0,1-10 mg), ácido linoleico (0,1-10 g), fitoesteroles (1-100 mg), *α*-tocoferol (0,1-10 mg), derivado de tirosol (0,01-1 mg).

3. Producto, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que, como mínimo, el ácido oleico actúa como antioxidante.

4. Producto, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que, como mínimo, el ácido oleico actúa como inhibidor de NF-*κ*B.

5. Producto, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que, como mínimo, el licopeno actúa como antioxidante.

6. Producto, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que, como mínimo, el licopeno actúa como inhibidor de NF-*κ*B.

7. Producto, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que el ácido linoleico actúa como antioxidante adicional.

8. Producto, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que el ácido palmitoleico actúa como antioxidante adicional.

9. Producto, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que el *α*-tocoferol actúa como antioxidante adicional.

10. Producto, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que un derivado de tirosol actúa como antioxidante adicional.

11. Producto, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que los fitoesteroles actúan como antioxidante adicional.

12. Utilización de una combinación de licopeno y ácido oleico junto con uno o varios de los siguientes compuestos:

(a) *β-caroteno* y/o una cantidad equimolar de sus derivados, tales como retinol (vitamina A) y derivados del mismo;

(b) *retinol* y todos sus derivados por acción (bio)química, preferiblemente, sus isómeros retinol todo-trans y 11-cis retinol, los productos de oxidación ácido retinoico todo-trans, ácido 13-cis retinoico, ácido 9-cis retinoico y el producto de reducción 11-cis retinal, junto con todos los derivados del mismo;

(c) *ácidos grasos libres*, tales como el ácido linoleico, linolénico, palmítico, esteárico, araquidónico, palmitoleico, gadoleico y behénico, así como los derivados por (de)saturación de los mismos, preferiblemente, ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico, araquidónico;

(d) *fitoesteroles*, tales como *β*-sitosterol, campesterol, estigmasterol, cicloartenol, sitostanol, campestanol, preferiblemente *β*-sitosterol, o concentraciones equimolares de sus derivados (conjugados de ácidos grasos libres formando ésteres) y sus productos de saturación, tales como los tocoferoles junto con sus isómeros *α*-vitamina E-, *β* y *γ*, y otros tocotrienoles;

(e) *tirosol* y sus derivados procedentes de la hidrogenación, tales como el hidroxitirosol [2-(3,4-dihidroxifenil) etanol].

ES 2 285 923 B1

para la preparación de un nuevo producto que se administra por vía oral y actúa como:

(a) antioxidante, ya que puede regular la oxidación de las LDL que provocan el desarrollo de la enfermedad cardiovascular;

(b) regulador de procesos inflamatorios debido a la presencia de compuestos inhibidores del factor de transcripción NF- κ B, donde dichos procesos se relacionan con la aparición y el desarrollo de diversas patologías crónicas, tales como la enfermedad cardiovascular, la artritis reumatoide, y la inflamación asociada a tumores;

(c) potencialmente anticancerígeno, ya que puede impedir, disminuir o retrasar el riesgo de cáncer de diversas etiologías.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 285 923

⑫ Nº de solicitud: 200503082

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 14.12.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **A61K 31/201** (2006.01)
A61K 31/07 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2244563 T3 (JOHNSON & JOHNSON CONSUMER FRANCE) 01.08.2001, todo el documento.	1,3,5,7,9
Y		6
Y	DORAI, T. et al.: Role of Chemopreventive Agents in Cancer Therapy", Cancer Lett. (2004), vol. 215, pp.: 129-140, todo el documento.	6
Y	GI-YOUNG K. et al.: "Lycopene Suppresses the Lipopolysaccharide-Induced Phenotypic and Functional Maturation of Murine Dendritic Cells Through Inhibition of Mitogen-Activated Protein Kinases and Nuclear Factor- κ B", Immunology (2004), vol. 113, pp.: 203-211, todo el documento.	6
X	FDA, U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Department of Health and Human Services. U.S. FDA/CFSAN: Agency Response Letter: GRAS Notice No. GRN 000156, 07 de febrero de 2005, [recuperado el 24.04.2007]. Recuperado de Internet <VRL: http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g156.html >	1,3,5,7,9, 11
Y		4
Y	MASSARO, M. et al.: "Mechanisms for Reduction of Endothelial Activation by Oleate: Inhibition of Nuclear Factor- κ B Through Antioxidant Effects", Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (2002), vol. 67 (2-3), pp.: 175-181, todo el documento.	4
X	WO 0151088 A1 (CINCOTTA, A.) 19.07.2001, todo el documento.	1, 3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.10.2007

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 285 923

⑫ Nº de solicitud: 200503082

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 14.12.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **A61K 31/201** (2006.01)
A61K 31/07 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CN 1634075 A (KUNMING XIANGHAO TECHNOLOGY CO. LTD.) 06.07.2005, (resumen) BASE DE DATOS WPI en EPOQUE, [en línea] [recuperado el 23.04.2007] Recuperado en EPO-WPI Database, DW200582, Nº de acceso 2005-798108.	1,12
A	LAZOS, E.S. et al.: Characteristics and Composition of Tomato Seed Oil", Grasas y Aceites (1988), vol. 49, fasc. 5-6, pp.: 440-445.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.10.2007

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

2/2