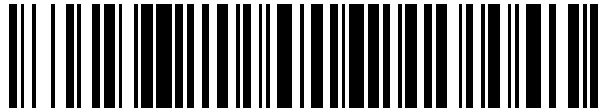


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 173**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/015** (2006.01)  
**A61K 31/01** (2006.01)  
**A61K 31/05** (2006.01)  
**A61K 31/07** (2006.01)  
**A61K 31/12** (2006.01)  
**A61K 31/192** (2006.01)  
**A61K 31/225** (2006.01)  
**A61K 31/352** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2010 E 10731120 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2381935**

54 Título: **Combinaciones sinérgicas de carotenoides y polifenoles**

30 Prioridad:

**19.01.2009 US 145593 P**  
**04.12.2009 US 266517 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.08.2016**

73 Titular/es:

**LYCORED LTD. (100.0%)**  
**P.O. Box 320**  
**84102 Beer Sheva, IL**

72 Inventor/es:

**ZELKHA, MORRIS;**  
**LEVY, RACHEL;**  
**PARAN, ESTHER;**  
**SHARONI, YOAV y**  
**LEVY, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 580 173 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

Combinaciones sinérgicas de carotenoides y polifenoles

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición que comprende combinaciones sinérgicas de polifenoles y carotenoides. Más específicamente, la presente invención proporciona una composición que comprende una combinación sinérgica de los compuestos anteriormente mencionados, que se puede usar, entre otros, para inhibir la producción de diversos mediadores inflamatorios.

**Antecedentes de la invención**

Los procesos inflamatorios, que forman una parte importante del sistema inmune no específico, se caracterizan por un conjunto complejo de cambios celulares y químicos que son esenciales para la defensa del huésped frente a agentes microbianos y otros factores ambientales potencialmente perjudiciales. Sin embargo, en muchos casos, la inflamación se puede desencadenar de forma inapropiada, y/o puede persistir hasta el punto de que llegue a ser perjudicial para el huésped. En tales casos, puede ser necesario inhibir o prevenir el desarrollo de uno o más aspectos del proceso inflamatorio, en particular en los casos de enfermedades inflamatorias no infecciosas.

Se ha demostrado que un gran número de diferentes mediadores químicos están implicados en el desarrollo y el control de los procesos inflamatorios. Estudios recientes de una serie de laboratorios diferentes han implicado el óxido nítrico (NO) como un importante modulador de varios trastornos inflamatorios crónicos y agudos, que incluyen diversos tipos de artritis, enfermedades gastrointestinales, afecciones inflamatorias del sistema nervioso central y determinadas formas de asma. Por consiguiente, se ha propuesto que la inhibición de la producción de NO podría proporcionar un mecanismo terapéutico útil para el tratamiento y/o el control de estos trastornos inflamatorios. Asimismo, la inhibición de la síntesis del NO se ha demostrado que es útil en algunas afecciones o estados que no son fundamentalmente de naturaleza inflamatoria. Así, por ejemplo, se ha descubierto que la inhibición de la síntesis del NO reduce la captación de glucosa en los tejidos de las extremidades en individuos con diabetes Tipo 2 durante el ejercicio.

La producción *in vivo* del NO está mediada por una familia de enzimas óxido nítrico sintasas (NOS), que incluyen la óxido nítrico sintasa inducible (i-NOS), que es activada por muchos estímulos inmunológicos diferentes que incluyen lipopolisacáridos (LPS), el interferón gamma y la interleucina 1 (IL-1).

La inhibición de la NOS se puede conseguir *in vitro* e *in vivo* mediante el uso del citrato de L-N<sup>G</sup>-monometil arginina (LN<sup>G</sup>MA). Adicionalmente, otros compuestos diversos, que incluyen un número de productos naturales, se ha demostrado que inhiben la producción de NO. Este último grupo incluye compuestos tales como la luteína [Rafi M.M. et al. *Mol Nutr Food Res.* 2007 Mar; 51(3):333-40; Choi, J.S. *Nutrition.* 2006 Jun; 22(6):668-71] y el licopeno [Rafi, M.M. et al. *J Food Sci.* 2007 En; 72(1):S069-74]. Sin embargo, la eficacia y la potencia de muchos de los productos naturales inhibidores del NO se ha demostrado que no son particularmente elevadas. Existe, por tanto, la necesidad de composiciones mejoradas de origen natural que inhiban la producción de NO.

Otro mediador inflamatorio extremadamente importante es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), que es una citocina producida por varios tipos de células que incluyen macrófagos, neutrófilos y linfocitos. El TNF-alfa ocupa una posición clave en la fase temprana de los procesos inflamatorios y es responsable de la estimulación de la producción de otros factores tales como el factor nuclear κB, el cual, a su vez, provoca la activación de una amplia gama de genes pro-inflamatorios. Así pues, en vista de su papel pro-inflamatorio clave, el TNF-alfa es claramente una importante diana terapéutica potencial para agentes antiinflamatorios.

Un tercer mediador inflamatorio es la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), un miembro de la familia de los eicosanoides de moléculas reguladoras. Así, la PGE<sub>2</sub> es producida en cantidades significativas en los sitios inflamatorios, donde actúa como vasodilatador, y también (junto con otros mediadores tales como la histamina y la bradiquinina) causa un aumento de la permeabilidad vascular, contribuyendo de este modo a la mayoría de los signos clásicos de la inflamación.

Finalmente, otro mediador pro-inflamatorio que es liberado por células inflamatorias tales como macrófagos y neutrófilos es el ion superóxido. Aunque los iones superóxido son altamente eficaces en cuanto a destruir invasores microbianos, en otras afecciones inflamatorias (particularmente no infecciosas), estos iones pueden causar un extenso daño en los tejidos del huésped. La producción de iones superóxido, por tanto, es una diana terapéutica potencialmente útil cuando se consideran nuevos medios para controlar los estados inflamatorios.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición que se pueda usar para inhibir la producción de uno o más mediadores inflamatorios claves, tales como los iones superóxido, el NO, el TNF-alfa y/o la PGE<sub>2</sub>, como medio para tratar o controlar patologías y procesos patológicos en los que están implicados dichos mediadores.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición que sea capaz de inhibir la producción de los mediadores inflamatorios anteriormente mencionados con mayor eficacia y/o potencia que los compuestos y composiciones presentados en el estado de la técnica.

## 5 Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto ahora inesperadamente que compuestos polifenólicos pueden actuar de forma sinérgica con carotenoides en la inhibición de diversas vías pro-inflamatorias. En particular, se ha descubierto ahora que el compuesto polifenólico ácido carnósico produce una mejora sinérgica del efecto inhibitor de determinados carotenoides tales como el licopeno, la luteína y el beta-caroteno sobre la producción de los mediadores inflamatorios NO, TNF-alfa y PGE. Asimismo, aunque este efecto sinérgico se observa en combinaciones binarias de ácido carnósico junto con licopeno, beta-caroteno o luteína, la sinergia es significativamente mayor cuando el ácido carnósico se combina con dos de los carotenoides anteriormente mencionados. El efecto antiinflamatorio sinérgico anteriormente mencionado se observa también cuando los carotenoides están presentes en combinación con otros polifenoles tales como quercetina, resveratrol y ácido gálico.

La presente invención, por tanto, se dirige principalmente a una composición terapéutica para su uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias en las que los iones superóxido, el NO, el TNF-alfa y/o la PGE<sub>2</sub> actúan como moduladores o mediadores de dicha afección mediante la inhibición o la reducción de la producción de iones superóxido, NO, TNF-alfa y/o PGE<sub>2</sub> en un sujeto humano, en el que la afección que se va a tratar se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, síndrome de insuficiencia respiratoria en el adulto (ARDS), asma, rinitis, fibrosis pulmonar idiopática, peritonitis, inflamación cardiovascular, isquemia miocárdica, lesión por reperfusión, aterosclerosis, septicemia, traumatismo, diabetes tipo II, retinopatía, psoriasis, inflamación gastrointestinal, cirrosis, peritonitis y enfermedad inflamatoria intestinal, y enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer; comprendiendo dicha composición terapéutica ácido carnósico y dos o más carotenoides seleccionados entre el grupo que consiste en luteína, licopeno y beta-caroteno, en la que la zeaxantina comprende hasta el 15 % del contenido de luteína, y en la que dichos componentes están presentes en los siguientes intervalos de peso:

licopeno : luteína : beta-caroteno : ácido carnósico :

0,1-1,0 : 0,1-1,0 : 0,1-1,0 : 0,1-1,0 y

en la que cada uno de los agentes activos en dicha composición terapéutica se ha de administrar en una cantidad diaria en el intervalo de 1 a 5 mg.

Los polifenoles usados en las composiciones divulgadas también en el presente documento se seleccionan entre el grupo que consiste en quercetina, resveratrol, ácido gálico, ácido cicórico, gingerol y curcumina.

En una realización, la composición terapéutica anteriormente mencionada comprende ácido carnósico, licopeno y luteína.

En otra realización preferente, la composición comprende ácido carnósico, luteína y beta-caroteno.

En otra realización aún más preferente, la composición comprende licopeno, beta-caroteno y ácido carnósico.

En otra realización, la composición consiste esencialmente en licopeno, luteína y ácido carnósico.

En una realización preferente adicional, la composición consiste esencialmente en luteína, beta-caroteno y ácido carnósico.

En una realización preferente adicional, la composición consiste esencialmente en licopeno, beta-caroteno y ácido carnósico.

Es necesario señalar que el término "consiste esencialmente en", tal y como se usa a lo largo de esta descripción y reivindicaciones adjuntas, se refiere a la situación en la que la composición de la presente invención puede comprender, además de los elementos mencionados (es decir, ácido carnósico junto con licopeno y/o luteína), otros compuestos, sustancias y agentes que no influyen materialmente en las características básicas y nuevas de la presente invención.

En otras realizaciones preferentes, las composiciones de las realizaciones preferentes anteriormente divulgadas pueden comprender adicionalmente uno o más carotenoides adicionales. En una realización particularmente preferente, los carotenoides adicionales se seleccionan entre el grupo que consiste en fitoeno y fitoflueno.

Los componentes activos de las composiciones anteriormente divulgadas (es decir, polifenol o polifenoles y carotenoides) pueden ser compuestos purificados, compuestos sintéticos o pueden estar presentes en mezclas con

otros componentes, por ejemplo, en extractos de plantas tales como un extracto de romero (en el caso del ácido carnósico), un extracto de caléndula (en el caso de la luteína) o un extracto de tomate (tal como Lycomato - que está comercializado por LycoRed, Re'er Sheva, Israel - en el caso del licopeno y otros carotenoides).

5 Se ha de señalar que el término "luteína", tal y como se usa en la presente divulgación, debe entenderse que incluye en su alcance todos los ésteres de la luteína. Además, el término "luteína" se debe interpretar también como que incluye en su alcance una mezcla de luteína y zeaxantina, ya que este último carotenoide mencionado está presente frecuentemente junto con la luteína (constituyendo a veces un 0,1-15 %, y más frecuentemente un 4-6 % del contenido de la luteína).

10 También se describe un método para inhibir o reducir la producción de iones superóxido, NO, TNF-alfa y/o PGE<sub>2</sub> en un sujeto mamífero que comprende administrar a dicho sujeto cualquiera de las composiciones terapéuticas anteriormente divulgadas en el presente documento.

15 También se describe un método para el tratamiento de afecciones patológicas en las que los iones superóxido, el NO, el TNF-alfa y/o la PGE<sub>2</sub> actúan como modulador o mediador de dicha afección en un sujeto mamífero que necesita tal tratamiento, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto cualquiera de las composiciones terapéuticas anteriormente divulgadas en el presente documento. La afección que se va a tratar se puede seleccionar entre el grupo que consiste en afecciones inflamatorias agudas, afecciones inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, síndrome de insuficiencia respiratoria en el adulto (ARDS), asma, rinitis, fibrosis pulmonar idiopática, peritonitis, inflamación cardiovascular, isquemia miocárdica, lesión por reperfusión, aterosclerosis, septicemia, traumatismo, diabetes tipo II, retinopatía, psoriasis, inflamación gastrointestinal, cirrosis, peritonitis y enfermedad inflamatoria intestinal, y enfermedades neurodegenerativas, tal como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (AD).

25 En los métodos anteriormente divulgados en el presente documento, el sujeto mamífero es un sujeto humano.

Aunque en los métodos anteriormente divulgados la composición terapéutica se puede administrar mediante cualquier medio conveniente, en una realización preferente dicha composición se administra en una forma farmacéutica. En otra realización preferente, sin embargo, la composición terapéutica se incorpora en un alimento o una bebida.

30 También se describe el uso de una combinación, de uno o más polifenoles y dos o más carotenoides seleccionados entre el grupo que consiste en licopeno, beta-caroteno y luteína en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de afecciones sensibles a la inhibición de la producción de NO, TNF-alfa y/o PGE<sub>2</sub>.

Los polifenoles divulgados en el presente documento incluyen ácido carnósico, quercetina, resveratrol, ácido gálico, ácido cicórico, gingerol y curcumina.

40 De acuerdo con la presente invención, el polifenol es ácido carnósico.

La afección que se va a tratar es una afección inflamatoria.

45 La afección que se va a tratar se selecciona entre el grupo que consiste en afecciones inflamatorias agudas, afecciones inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, síndrome de insuficiencia respiratoria en el adulto (ARDS), asma, rinitis, fibrosis pulmonar idiopática, peritonitis, inflamación cardiovascular, isquemia miocárdica, lesión por reperfusión, aterosclerosis, septicemia, traumatismo, diabetes tipo II, retinopatía, psoriasis, inflamación gastrointestinal, cirrosis, peritonitis y enfermedad inflamatoria intestinal, y enfermedades neurodegenerativas, tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (AD).

50 En una realización particularmente preferente de este aspecto de la invención, el ácido carnósico se usa en combinación tanto con licopeno como con luteína.

55 En otra realización particularmente preferente de este aspecto de la invención, el ácido carnósico se usa en combinación tanto con licopeno como con beta-caroteno.

En una realización particularmente aún más preferente de este aspecto de la invención, el ácido carnósico se usa en combinación tanto con luteína como con beta-caroteno.

60 Todo lo anterior y otras características y ventajas de la presente invención se entenderán más a fondo a partir de los siguientes ejemplos ilustrativos de las realizaciones preferentes de la misma.

#### Breve descripción de las figuras

65 La **Fig. 1** representa gráficamente la interacción sinérgica de ácido carnósico y licopeno en la inhibición de la producción de NO por macrófagos peritoneales. El gráfico superior muestra los resultados obtenidos con

licopeno purificado, mientras que el gráfico inferior presenta los resultados obtenidos con un extracto de tomate rico en licopeno.

5 La **Fig. 2a** ilustra gráficamente la interacción sinérgica entre ácido carnósico y licopeno purificado (gráfico superior) y entre ácido carnósico y un extracto de tomate rico en licopeno (gráfico inferior) en la inhibición de la producción de NO por macrófagos peritoneales.

10 La **Fig. 2b** ilustra gráficamente las interacciones sinérgicas entre licopeno y diversas combinaciones de luteína, ácido carnósico y beta-caroteno en la inhibición de la producción de NO por macrófagos peritoneales. El gráfico superior muestra los resultados obtenidos con licopeno purificado, mientras que el gráfico inferior presenta los resultados obtenidos con un extracto de tomate rico en licopeno.

15 La **Fig. 2c** ilustra adicionalmente las interacciones sinérgicas entre licopeno y diversas combinaciones de luteína, ácido carnósico y beta-caroteno en la inhibición de la producción de NO por macrófagos peritoneales. El gráfico superior muestra los resultados obtenidos con licopeno purificado, mientras que el gráfico inferior presenta los resultados obtenidos con un extracto de tomate rico en licopeno.

20 La **Fig. 3** ilustra gráficamente las interacciones sinérgicas entre licopeno y diversas combinaciones de luteína, ácido carnósico y beta-caroteno en la inhibición de la producción de TNF-alfa por macrófagos peritoneales. El gráfico superior muestra los resultados obtenidos con licopeno purificado, mientras que el gráfico inferior presenta los resultados obtenidos con un extracto de tomate rico en licopeno.

25 La **Fig. 4** ilustra gráficamente las interacciones sinérgicas entre licopeno y diversas combinaciones de luteína, ácido carnósico y beta-caroteno en la inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub> por macrófagos peritoneales, en comparación con el efecto no sinérgico de combinaciones que excluyen al licopeno.

30 La **Fig. 5a** ilustra gráficamente las interacciones sinérgicas entre licopeno purificado y diversas combinaciones de distintas mezclas de luteína, ácido carnósico y beta-caroteno en la inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub> por macrófagos peritoneales.

35 La **Fig. 5b** ilustra gráficamente las interacciones sinérgicas entre un extracto de tomate rico en licopeno y diversas combinaciones de distintas mezclas de luteína, ácido carnósico y beta-caroteno en la inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub> por macrófagos peritoneales.

La **Fig. 6** ilustra gráficamente las interacciones sinérgicas entre luteína, beta-caroteno y ácido carnósico en la inhibición de la producción estimulada con LPS de NO por macrófagos peritoneales.

40 La **Fig. 7** ilustra gráficamente las interacciones sinérgicas entre luteína, beta-caroteno y ácido carnósico en la inhibición de la producción estimulada con LPS de TNF $\alpha$  por macrófagos peritoneales.

45 La **Fig. 8** ilustra gráficamente la interacción sinérgica entre licopeno, luteína y diversos polifenoles en la inhibición de la producción estimulada con LPS de NO por macrófagos peritoneales. El gráfico A presenta los resultados usando licopeno purificado, mientras que el gráfico B presenta los resultados obtenidos usando un extracto de tomate rico en licopeno (Lyc-O-Mato).

50 La **Fig. 9** ilustra gráficamente la interacción sinérgica entre licopeno, luteína, beta-caroteno y ácido carnósico en la inhibición de la producción de iones superóxido por macrófagos. El gráfico A presenta los resultados usando licopeno purificado, mientras que el gráfico B presenta los resultados obtenidos usando un extracto de tomate rico en licopeno (Lyc-O-Mato)

55 La **Fig. 10** demuestra la interacción sinérgica entre licopeno o Lyc-O-Mato con luteína y ácido carnósico en la inhibición de la fosforilación de p65-NFkB en Serina 536 en lisados nucleares de células, tras una preincubación de 10 minutos con LPS. La porción superior de la figura presenta los resultados de la transferencia de Western a partir de los cuales se obtuvieron los datos gráficos.

60 La **Fig. 11** ilustra gráficamente la interacción sinérgica entre licopeno o Lyc-O-Mato con luteína y ácido carnósico en la inhibición de la expresión de las proteínas nítrico óxido sintasa inducible por LPS (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX2) en lisados celulares totales.

## 60 Descripción detallada de las realizaciones preferentes

65 Las composiciones descritas en el presente documento comprenden combinaciones de uno o más polifenoles con uno o más carotenoides. En la presente invención, las composiciones comprenden ácido carnósico como único polifenol y uno o más carotenoides seleccionados entre el grupo que consiste en licopeno (bien purificado o bien contenido en un extracto de tomate), luteína y beta-caroteno. En otras composiciones descritas en el presente documento, el único componente polifenólico se selecciona entre el grupo que consiste en quercetina, resveratrol y

ácido gálico.

La cantidad diaria de cada uno de estos agentes activos presentes en las composiciones que se administran a sujetos que necesitan tal administración es la siguiente:

- 5  
 Ácido carnósico: 1 a 5 mg  
 Licopeno: 1 a 5 mg  
 Luteína: 1 a 5 mg  
 Beta-caroteno: 1 a 5 mg

10 La cantidad de cada uno de los diversos componentes activos se selecciona de tal modo que las proporciones en peso se encuentren dentro de los siguientes intervalos amplios:

- 15 Licopeno : Luteína : Beta-caroteno : Ácido carnósico  
 0,1-1,0 : 0,1-1,0 : 0,1-1,0 : 0,1-1,0

En una realización preferente, los componentes activos se pueden combinar en la siguiente proporción:

- 20 Licopeno : Luteína : Beta-caroteno : Ácido carnósico  
 1,0 : 1,0 : 1,0 : 0,5

En otra realización preferente, los componentes activos se pueden combinar en la siguiente proporción:

- 25 Licopeno : Luteína : Beta-caroteno : Ácido carnósico  
 1,0 : 0,3 : 0,3 : 0,4

En otra realización preferente adicional, los componentes activos se pueden combinar en la siguiente proporción:

- 30 Licopeno : Luteína : Beta-caroteno : Ácido carnósico  
 1,0 : 1,0 : 1,0 : 1,0

35 Cabe señalar que las composiciones preparadas de acuerdo con los anteriores ejemplos de proporciones en peso preferentes no requieren la presencia obligatoria de los cuatro componentes citados; sino que, más bien, es suficiente que la composición comprenda ácido carnósico (u otro polifenol) junto con al menos dos de los carotenoides indicados, en la que la cantidad relativa de cada uno de estos componentes es la indicada por las cifras proporcionadas inmediatamente antes en el presente documento.

En otras composiciones divulgadas en el presente documento, los componentes activos se pueden combinar en los siguientes intervalos de proporciones en peso:

- 40  

Licopeno	: Luteína	: Beta-caroteno	: Ácido carnósico
0,1-1,0	: 0,1-5,0	: 0,1-1,0	: 0,1-1,0

O en los siguientes intervalos de proporciones en peso:

Licopeno	: Luteína	: Beta-caroteno	: Ácido carnósico
0,1-1,0	: 1,0-4,0	: 0,1-1,0	: 0,1-1,0

45 O en las siguientes proporciones en peso:

Licopeno	: Luteína	: Ácido carnósico
0,1	: 1,73	: 0,13

Licopeno	: Luteína	: Ácido carnósico
0,1	: 1,80	: 0,26

Beta-caroteno	: Luteína	: Ácido carnósico
0,29	: 1,29	: 0,1

Beta-caroteno	: Luteína	: Ácido carnósico
0,39	: 1,29	: 0,1

Beta-caroteno	: Luteína	: Ácido carnósico
0,32	: 3,42	: 0,1

- 50  

Beta-caroteno	: Luteína	: Ácido carnósico
0,16	: 1,71	: 0,1

Beta-caroteno	: Luteína	: Ácido carnósico
0,29	: 1,29	: 0,1

Beta-caroteno	: Luteína	: Ácido carnósico
0,39	: 1,29	: 0,1

5 Los diversos componentes activos se pueden formular bien para uso sistémico o bien para uso tópico. En el caso de la administración sistémica, el polifenol o polifenoles y el carotenoide o carotenoides se pueden incorporar a formas farmacéuticas orales tales como comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas, jarabes, elixires, líquidos, etc.

10 En otras realizaciones preferentes, la composición de la presente invención se puede administrar por vía tópica, por ejemplo sobre la piel o membranas mucosas (por ejemplo, en forma de cremas, lociones, pomadas, etc.). Detalles adicionales de los métodos adecuados para incorporar la composición que contiene polifenoles y carotenoides de la presente invención a las diversas formas farmacéuticas diferentes se pueden obtener, por ejemplo, a partir de cualquier trabajo de referencia convencional conocido por el experto en la materia que incluye, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack publishing Co, Easton, Pa, EE.UU. (1980).

15 En otras realizaciones preferentes, la composición de la presente invención se prepara en forma de aditivo alimentario que es adecuado para su incorporación directa a un alimento o una bebida.

20 El ácido carnósico usado para preparar las composiciones de la presente invención se puede obtener en el mercado a partir de distintos proveedores que incluyen Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza. Los carotenoides se obtuvieron de varios proveedores diferentes que incluyen LycoRed Ltd., Be'er Sheva, Israel.

25 Como alternativa, algunos de los componentes de la composición, tales como el licopeno, se pueden incorporar a dicha composición en forma de un extracto de tomate rico en licopeno. Uno de tales extractos de tomate rico en licopeno es comercializado por LycoRed Ltd., Beer Sheva, Israel con el nombre comercial "Lyc-O-MatoO" (por ejemplo en forma de cápsulas). Procesos adecuados para preparar este extracto y extractos similares se describen en el documento US 5.837.311. No obstante, se ha de reconocer que se pueden usar muchos otros tipos de procedimientos de preparación para obtener la composición que contiene carotenoides a partir de diversas fuentes vegetales. Asimismo, la composición también se puede preparar a partir de uno o más carotenoides sintéticos.

30 Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos a fin de explicar y describir más particularmente la presente invención. No obstante, la presente invención no se limita a las realizaciones particulares divulgadas en estos ejemplos.

#### Ejemplo 1

35 Inhibición de la producción de NO, TNF-alfa y PGE<sub>2</sub> en macrófagos peritoneales mediante diversas combinaciones de ácido carnósico, luteína, licopeno y beta-caroteno

#### Métodos y materiales:

40 *Aislamiento de los macrófagos y cultivo celular* - Se recogieron macrófagos peritoneales de la cavidad peritoneal de ratones ICR macho de 6-8 semanas de edad (Harlan, Israel) a los que se les había administrado una inyección intraperitoneal de 1,5 ml de caldo tioglicolato (4 %) 4 días antes de la cosecha. Los macrófagos peritoneales se lavaron tres veces con PBS y, en caso necesario, se efectuó una lisis hipotónica de eritrocitos, dando una pureza del 90-95 %. Los macrófagos se identificaron mediante análisis FACS usando un anticuerpo anti-ratón F4/80 conjugado con FTIC (MCA497F) (Serotec, Oxford, Inglaterra) mediante microfluorimetría de flujo sobre FACS (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Para cada muestra, se analizaron 10.000 células viables seleccionadas e identificadas mediante dispersión de luz. Se cultivaron macrófagos peritoneales y la línea celular RAW264.7 de macrófagos murinos en medio RPMI 1640 que contenía un 10 % de FCS, L-glutamina 2 mM; 100 U/ml de penicilina; 100 µg/ml de estreptomycin (Beit-Haemek, Israel) en placas de 96 pocillos (1 x 10<sup>6</sup> células/pocillo) a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se estimularon con LPS (0,1-1 µg/ml) en presencia o ausencia de ácido carnósico y/o uno o más de los siguientes carotenoides: ácido carnósico, licopeno purificado, extracto de tomate rico en licopeno (LycO-Mato®; LycoRed Ltd., Be'er Sheva, Israel), luteína y beta-caroteno.

55 El ácido carnósico y los diversos carotenoides se disolvieron en DMSO (hasta una concentración final de 5 mM). La mezcla se agitó con formación de vórtice y se incubó en un baño de agua a 37 °C (con agitación) durante 10 min y después se sometió a ultrasonidos en un baño de ultrasonidos tres veces durante 15 segundos cada vez. Usando esta solución madre se prepararon las concentraciones deseadas mediante la adición de volúmenes apropiados de la misma al medio de cultivo caliente.

60 Se determinó la concentración de licopeno en la solución después de una extracción tal como sigue: se añadieron 0,5 ml de isopropanol + 1,5 de hexano/diclorometano (1:5 v/v) que contenía un 0,025 % de BHT a 1 ml de solución de licopeno recién preparada con una concentración de 20 µM en medio precalentado. La solución se agitó con

formación de vórtice y las fases se separaron mediante centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 min.

Se llevó a cabo un análisis espectral para medir el contenido de licopeno (pico de absorción a 471 nm).

- 5 Se añadieron volúmenes apropiados de DMSO (0,1-0,2 %) a los controles y se calculó el porcentaje de inhibición en cada tubo de ensayo con relación a su control.

10 *Ensayo de producción de NO* - Se determinaron los niveles de NO en los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante el ensayo de los niveles de nitrito usando el reactivo de Griess y nitrito sódico como patrón según se describe en Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., y Tannenbaum, S. R. (1982) *Anal Biochem.* 126: 131-138.

15 *Medición de la PGE<sub>2</sub>* - Se recogieron los sobrenadantes de células estimuladas y en reposo y se almacenaron inmediatamente a -70 °C. Los niveles de PGE<sub>2</sub> se determinaron usando un protocolo de radioinmunoensayo con carbón recubierto con dextrano tal y como se ha descrito previamente (Dror N, Tveria L, Meniv I, Ben-Shmuel S, Filipovich T, Fleisher-Berkovich S., *Regul Pept.* 2008 150: 21-5).

20 Brevemente, 100 µl de muestra o de PGE<sub>2</sub> patrón (Sigma Israel, Rehovot, Israel) se incubaron en presencia de 500 µl de antisuero anti-PGE<sub>2</sub> (Sigma Israel, Rehovot, Israel) durante 30 min. A continuación se añadió [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> (Amersham Biosciences, NJ, EE.UU.) durante 24 h a 4 °C. Transcurridas las 24 h, se añadieron 200 µl de una suspensión fría de carbón recubierto con dextrano a cada tubo de ensayo y se incubaron durante 10 min sobre hielo. Los tubos se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 15 min a 4 °C. Se efectuó el recuento de 500 µl de sobrenadantes que contenían complejos [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub>-anti-PGE<sub>2</sub> (Packard Spectrometry 1900CA) y se calculó la cantidad de PGE<sub>2</sub>.

25 *Ensayo de producción de TNF-alfa* - Se cuantificaron las concentraciones de TNF-alfa usando kits de ELISA (Biolegend Inc., San Diego, CA).

30 *Análisis estadístico* - Los datos se presentan como la media ± ETM. Se determinó la significancia estadística para las comparaciones entre grupos usando una prueba t de Student bilateral para muestras dependientes.

## RESULTADOS

Fig. 1

35 *Inhibición sinérgica dependiente de la dosis de la producción de NO mediante combinación de licopeno o Lycomato con ácido carnósico.*

40 Los resultados obtenidos usando ácido carnósico o carotenoides individuales por separado son los siguientes: El licopeno o el Lycomato en el intervalo de 1-5 µM producía un bajo nivel de inhibición de la producción de NO. El ácido carnósico (1 y 2 µM) producía un 12 % y un 18 %, respectivamente, de inhibición de la producción de NO.

45 La adición de ácido carnósico a licopeno o Lycomato producía una inhibición sinérgica de la producción de NO que era dependiente de la dosis. La combinación de ácido carnósico con Lycomato es más eficaz que con licopeno purificado.

Los resultados presentados en la Fig. 1 son la media ± ETM de 10 experimentos independientes cada uno por duplicado.

Fig. 2a.

50 *Inhibición de la producción de NO mediante combinación de bajas concentraciones óptimas de dos componentes: licopeno o Lycomato con ácido carnósico, luteína y beta-caroteno.*

55 La combinación de licopeno o Lycomato 1 µM con ácido carnósico 2 µM producía una inhibición sinérgica significativa de la producción de NO, que era más eficaz en presencia de Lycomato en comparación con el licopeno.

La combinación de licopeno o Lycomato 1 µM con luteína 1 µM o con beta-caroteno 2 µM producía una inhibición aditiva o una inhibición sinérgica no significativa de la producción de NO, respectivamente.

60 La combinación de licopeno o Lycomato con ácido carnósico (es decir, la combinación de un carotenoide con un polifenol) es más eficaz que la combinación de dos carotenoides.



**Fig. 2b.**

*Inhibición de la producción de NO mediante combinación de bajas concentraciones óptimas de licopeno o Lycomato con otros dos componentes:*

5 La combinación de licopeno o Lycomato con ácido carnósico y luteína o con ácido carnósico y beta-caroteno (las mismas concentraciones que las usadas para generar los resultados mostrados en la Fig. 2a) producían una inhibición sinérgica significativa y similar de la producción de NO, mientras que una combinación que excluía el ácido carnósico solo producía un efecto aditivo (marcado con una elipse de línea discontinua).

10 La combinación de los cuatro componentes (es decir, licopeno o Lycomato junto con ácido carnósico, luteína y beta-caroteno) no mejoraba la combinación de los tres componentes.

**Fig. 2c.**

15 *Combinación de ácido carnósico y carotenoides que excluía al licopeno o Lycomato.*

20 La combinación de o bien luteína o bien beta-caroteno con ácido carnósico producía una inhibición sinérgica significativa y similar de la producción de NO (que es similar a la de la combinación de licopeno y ácido carnósico, aunque inferior a la observada con la combinación de Lycomato y ácido carnósico). La combinación de luteína y beta-caroteno producía un efecto aditivo (o menor).

25 Estos resultados confirman adicionalmente que se requieren tanto un carotenoide o carotenoides como un polifenol o polifenoles a fin de obtener el efecto sinérgico óptimo.

Estos resultados son la media  $\pm$  ETM de 3 experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado.

**Fig. 3.**

30 *Gráfico superior: Inhibición de la producción de TNF-alfa mediante diferentes combinaciones de bajas concentraciones óptimas de licopeno con ácido carnósico, luteína y beta-caroteno.*

35 La producción de TNF-alfa en el mismo grupo de experimentos que los de la Figura 2 era menos sensible que la producción de NO ya que ninguno de estos agentes produjo una inhibición detectable de la producción de TNF-alfa cuando se usaron por separado (es decir, no en combinación con otros agentes).

Las combinaciones de licopeno con ácido carnósico o con beta-caroteno produjeron un bajo nivel de inhibición sinérgica de la producción de TNF-alfa: un 10 % y un 8 %, respectivamente.

40 De un modo similar al efecto sobre la producción de NO, las combinaciones de licopeno con o bien ácido carnósico y luteína o bien ácido carnósico y beta-caroteno produjeron una inhibición sinérgica significativa y similar de la producción de TNF-alfa, la cual era mayor que la inhibición sinérgica producida por la combinación que excluía al ácido carnósico.

45 La combinación de ácido carnósico con los tres carotenoides no mejoraba el resultado sinérgico obtenido con la combinación mencionada anteriormente de ácido carnósico con dos carotenoides.

*Gráfico inferior: Inhibición de la producción de TNF-alfa mediante diferentes combinaciones de bajas concentraciones óptimas de Lycomato con ácido carnósico, luteína y beta-caroteno.*

50 La producción de TNF-alfa fue inhibida (10 %) en presencia de Lycomato (en contraste con la falta de inhibición detectable en presencia de licopeno). Las combinaciones de Lycomato con cada uno de los otros carotenoides produjeron una inhibición sinérgica que era mayor en presencia de ácido carnósico.

55 De un modo similar al efecto sobre la producción de NO, las combinaciones de Lycomato con ácido carnósico y luteína o con ácido carnósico y beta-caroteno produjeron una inhibición sinérgica significativa y similar de la producción de TNF-alfa, mientras que una combinación que excluía al ácido carnósico producía un efecto sinérgico menor.

60 Como en el caso del licopeno purificado, una combinación de ácido carnósico con los tres carotenoides no mejoraba el resultado sinérgico obtenido con la combinación mencionada anteriormente de ácido carnósico con dos carotenoides.

Los resultados son la media  $\pm$  ETM de 3 experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado.

65

Cabe señalar que las combinaciones que incluían Lycomato eran más eficaces en cuanto a inhibir la producción de TNF-alfa que aquellas que incorporaban licopeno purificado.

#### Fig. 4

5 *Inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub> mediante diferentes combinaciones de bajas concentraciones óptimas de licopeno con ácido carnósico, luteína y beta-caroteno.*

10 La producción de PGE<sub>2</sub> en el mismo grupo de experimentos que los comunicados para la Figura 2 era más sensible que la producción de NO con respecto al ácido carnósico o al beta-caroteno cuando se usaban por separado (aproximadamente un 20 % de inhibición cada uno). Las combinaciones de licopeno con luteína, ácido carnósico o beta-caroteno produjeron una inhibición sinérgica de la producción de PGE<sub>2</sub>.

15 Se pudo detectar un bajo nivel de inhibición sinérgica con una combinación de Lycomato con luteína y ácido carnósico solamente, mientras que una combinación con ácido carnósico y beta-caroteno producía solamente un efecto aditivo. Una combinación con luteína y beta-caroteno producía una inhibición aditiva de la producción de PGE<sub>2</sub>.

20 También se puede observar en la Fig. 4 que, una vez más, una combinación de cuatro agentes (ácido carnósico más los tres carotenoides) no mejoraba la combinación de ácido carnósico con dos carotenoides.

#### Fig. 5a

25 *Inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub> mediante diferentes combinaciones de bajas concentraciones óptimas de licopeno con ácido carnósico, luteína y beta-caroteno.*

30 Al igual que se ha mostrado en la Fig. 4, el gráfico superior de la Fig. 5a muestra que el ácido carnósico o el beta-caroteno (usados cada uno por separado) producía un alto nivel de inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub> (aproximadamente un 20 % de inhibición cada uno). Las combinaciones de licopeno con luteína, ácido carnósico o beta-caroteno produjeron una inhibición sinérgica de la producción de PGE<sub>2</sub>.

35 Se pudo detectar un bajo nivel de inhibición sinérgica en el caso de una combinación de licopeno con luteína y ácido carnósico solamente, mientras que una combinación con ácido carnósico y beta-caroteno producía solamente un efecto aditivo. Una combinación que contenía luteína y beta-caroteno producía una inhibición aditiva de la producción de PGE<sub>2</sub>. Por tanto, se estudiaron concentraciones menores (tal y como muestra el gráfico inferior de la Fig. 5a, discutido más adelante).

40 Una combinación de los cuatro agentes activos (es decir, ácido carnósico más los tres carotenoides) no mejoraba la combinación de ácido carnósico con dos carotenoides.

45 *Inhibición sinérgica de la producción de PGE<sub>2</sub> mediante diferentes combinaciones de menores concentraciones óptimas de ácido carnósico, luteína y beta-caroteno (gráfico inferior).*

45 Ni la luteína (0,5 μM) ni el beta-caroteno (1 μM) por separado influyeron en la producción de PGE<sub>2</sub>, mientras que el ácido carnósico (1 μM) produjo una inhibición del 10 %. En estas condiciones las combinaciones de licopeno 1 mM con menores concentraciones de cualquiera de los otros dos componentes produjo una inhibición sinérgica.

La combinación de los cuatro agentes activos no mejoraba la combinación de los tres.

#### 50 Fig. 5b

*Inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub> mediante diferentes combinaciones de bajas concentraciones óptimas de Lycomato con ácido carnósico, luteína y beta-caroteno.*

55 El gráfico superior muestra que el efecto del Lycomato sobre la inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub> es similar a la del licopeno puro y las combinaciones similares dieron como resultado un efecto similar al mostrado para el licopeno (gráfico superior de la Fig. 5a).

60 *Inhibición sinérgica de la producción de PGE<sub>2</sub> mediante diferentes combinaciones de menores concentraciones óptimas de ácido carnósico, luteína y beta-caroteno (gráfico inferior).*

65 Al igual que en la Fig. 5a, ni la luteína (0,5 μM) ni el beta-caroteno (1 μM) por separado influyeron en la producción de PGE<sub>2</sub>, mientras que el ácido carnósico (1 μM) produjo una inhibición del 10 %. La combinación de beta-caroteno era aditiva, mientras que la combinación con luteína o con ácido carnósico era sinérgica y mucho mayor que la obtenida con licopeno purificado (Fig. 5a). La combinación de Lycomato con ácido carnósico y luteína o con ácido carnósico y beta-caroteno producía una inhibición sinérgica significativa y similar de la producción de PGE<sub>2</sub>. Una

combinación de luteína y beta-caroteno (que excluía al ácido carnósico) produjo un menor nivel de inhibición sinérgica. A estas concentraciones, una combinación de Lycomato con luteína y ácido carnósico produjo un efecto sinérgico que era mucho mayor que el que resultó del uso de combinaciones con licopeno purificado.

- 5 Una combinación de los cuatro agentes activos (es decir, ácido carnósico más los tres carotenoides) no mejoraba la combinación de ácido carnósico con dos carotenoides.

**Fig. 6**

- 10 *Inhibición sinérgica de la producción de NO mediante combinaciones de luteína, beta-caroteno y ácido carnósico.*

Los dos gráficos superiores (A y B) ilustran la interacción sinérgica entre los tres componentes de la composición ensayada sobre la producción de NO, en la que la concentración final de beta-caroteno era de 0,5 µM. Análogamente, las composiciones que contenían una concentración mayor de beta-caroteno (1,0 µM; gráficos C y D) también produjeron una inhibición de tipo sinérgico de la producción de NO.

- 15

En cada uno de los gráficos presentados en la Fig. 6, la línea horizontal en la barra correspondiente a la composición de los tres componentes indica el nivel de inhibición del NO que se esperaría si el efecto de cada componente fuera aditivo. El aumento notable del nivel de inhibición observado (el área de la barra por encima de la línea horizontal marcada con una "S") indicaba que los tres componentes de la composición actuaban de modo sinérgico.

- 20

**Fig. 7**

- 25 *Inhibición sinérgica de la producción de TNFα mediante combinaciones de luteína, beta-caroteno y ácido carnósico.*

Los dos gráficos superiores (A y B) ilustran la interacción sinérgica entre los tres componentes de la composición ensayada sobre la producción de TNFα, en la que la concentración de beta-caroteno era de 0,5 µM. Análogamente, las composiciones que contenían una concentración mayor de beta-caroteno (1,0 µM; gráficos C y D) también produjeron una inhibición de tipo sinérgico de la producción de TNFα.

- 30

En cada uno de los gráficos presentados en la Fig. 7, la línea horizontal en la barra correspondiente a la composición de los tres componentes indica el nivel de inhibición del TNFα que se esperaría si el efecto de cada componente fuera aditivo. El aumento notable del nivel de inhibición observado (el área de la barra por encima de la línea horizontal marcada con una "S") indicaba que los tres componentes de la composición actuaban de modo sinérgico.

- 35

**Ejemplo 2**

- 40 Inhibición de la producción de NO inducida por LPS en macrófagos peritoneales mediante diversas combinaciones de luteína, licopeno y un polifenol seleccionado entre el grupo que consiste en ácido carnósico, ácido gálico\*, resveratrol\* y quercetina\* (\* = ejemplos comparativos)

Métodos y materiales:

- 45 *Aislamiento de los macrófagos y cultivo celular* - Se recogieron macrófagos peritoneales y se cultivaron tal como se describe en el Ejemplo 1 previo del presente documento.

*Preparación de los agentes del ensayo* - Se disolvieron licopeno y luteína en DMSO (el volumen de DMSO en la solución de ensayo no superaba el 0,04 %). La mezcla se agitó con formación de vórtice a 37 °C durante 10 min y se sometió a ultrasonidos en un baño de ultrasonidos durante 15 s x 3 veces. A partir de esta solución madre se alcanzaron las concentraciones deseadas mediante la adición de volúmenes apropiados al medio de cultivo caliente. La concentración de la solución se calculó para 1 ml de la concentración final más alta 0,5 ml de isopropanol + 1,5 ml de hexano/diclorometano (1:5 v/v) que contenía un 0,025 % de BHT. La solución se agitó con formación de vórtice y las fases se separaron mediante centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 min. Se llevó a cabo un análisis espectral para detectar el nivel de nutrientes. Se disolvieron en etanol ácido carnósico, resveratrol, ácido gálico o quercetina (el volumen de etanol en la solución de ensayo no superaba el 0,0025 %).

- 50
- 55

Se añadieron volúmenes apropiados de DMSO y/o etanol a los controles y se calculó el porcentaje de inhibición en cada tubo de ensayo con relación a su tubo de control.

- 60

*Ensayo de producción de NO* - Se determinaron los niveles de NO en los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante el ensayo de los niveles de nitrito usando el reactivo de Griess y nitrito sódico tal y como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

- 65

*Análisis estadístico* - Los datos se presentan como la media  $\pm$  ETM. Se determinó la significancia estadística para las comparaciones entre grupos usando una prueba t de Student bilateral para muestras dependientes.

Resultados:

5  
Figura 8

*A. Inhibición sinérgica de la producción de NO mediante combinaciones de bajas concentraciones de licopeno, luteína y cada uno de los diferentes polifenoles*

10  
Se incubaron macrófagos con licopeno 1  $\mu$ M, luteína 1  $\mu$ M y o bien ácido carnósico 2  $\mu$ M, o resveratrol 2  $\mu$ M, o ácido gálico 2  $\mu$ M o quercetina 2  $\mu$ M y combinaciones de los mismos durante 1 h antes de la adición de LPS durante 16 h a 37 °C. La producción de NO se midió y se calculó el % de inhibición. En cada experimento se analizó el efecto de tres concentraciones distintas de LPS, puesto que la sensibilidad de las células puede cambiar en diferentes experimentos.

15  
Las combinaciones de licopeno 1  $\mu$ M, luteína 1  $\mu$ M y o bien ácido carnósico o resveratrol o ácido gálico o quercetina 2  $\mu$ M produjeron una inhibición sinérgica significativa de la producción de NO (indicada por la letra "S" en el gráfico, en el que la línea horizontal que cruza cada barra, que representa las combinaciones sinérgicas, indica los resultados que se esperarían si la interacción fuera aditiva y no sinérgica). No hubo diferencias significativas entre cada una de estas combinaciones diversas. Tal y como se muestra en la Figura, el efecto de cada carotenoide o polifenol ensayado a la concentración dada era muy bajo. Según muestra la línea horizontal de cada gráfico, el efecto sinérgico era aproximadamente tres veces mayor que el efecto aditivo.

25  
*B. Inhibición sinérgica de la producción de NO mediante combinaciones de bajas concentraciones de Lyc-O-Mato, luteína y cada uno de los diferentes polifenoles.*

Se trataron los macrófagos como en el apartado A, aunque los experimentos se realizaron usando Lyc-O-Mato en lugar de licopeno.

30  
Si bien el Lyc-O-Mato por sí mismo producía una inhibición similar de la producción de NO que la producida por el licopeno, las combinaciones con Lyc-O-Mato eran más eficaces y daban como resultado un mayor efecto sinérgico de aproximadamente cuatro veces en comparación con el efecto aditivo.

35  
Los resultados mostrados en la Fig. 8 se dan como la media  $\pm$  ETM de tres experimentos diferentes, cada uno realizado por triplicado.

**Ejemplo 3**

40 Inhibición de la producción de iones superóxido inducida por LPS en macrófagos mediante diversas combinaciones de licopeno o Lyc-O-Mato, luteína, beta-caroteno y ácido carnósico

Métodos y materiales:

45 *Aislamiento de los macrófagos:* Se aislaron macrófagos peritoneales y se trataron tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

50 *Producción de iones superóxido:* La producción de aniones superóxido ( $O_2^-$ ) por los macrófagos se midió como la reducción del ferricitocromo c inhibible por la superóxido dismutasa mediante la técnica de las placas de microtitulación, tal y como es conocido en la técnica anterior. Se tomó una alícuota de macrófagos radiomarcados ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) usada para el ensayo de adherencia y se suspendió en 100  $\mu$ l de medio de incubación que contenía ferricitocromo c (150 nM). La estimulación se indujo con PMA (50 ng/ml). La reducción del ferricitocromo c se siguió mediante un cambio de absorbancia a 550 nm a intervalos de 2 min durante 30 min en un lector de microplacas Thermomax (Molecular Devices, Melno Park, Calif., EE.UU.). Se determinaron las velocidades máximas de producción de iones superóxido y se expresaron como nanomoles de  $O_2^-/10^6$  células/ 10 min usando el coeficiente de extinción  $E_{550} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Resultados:

60 Fig. 9

*Gráfico superior (A): Inhibición de la producción de iones superóxido mediante diferentes combinaciones de bajas concentraciones óptimas de licopeno purificado con ácido carnósico, luteína o beta-caroteno.*

65 La producción de iones superóxido fue inhibida en presencia de beta-caroteno 2  $\mu$ M (10 %).

Las combinaciones de licopeno con ácido carnósico o con beta-caroteno produjeron un bajo nivel de inhibición de la producción de iones superóxido que no fue significativamente diferente del efecto del beta-caroteno.

5 De un modo similar al efecto sobre la producción de NO (véase el Ejemplo 1 anterior del presente documento), las combinaciones de licopeno con o bien ácido carnósico y luteína o bien ácido carnósico y beta-caroteno produjeron una inhibición sinérgica significativa y similar de la producción de iones superóxido, la cual era mayor que la inhibición sinérgica producida por una combinación que excluía al ácido carnósico.

10 La combinación de ácido carnósico con los tres carotenoides no mejoraba el resultado sinérgico obtenido con la combinación mencionada anteriormente de ácido carnósico con dos carotenoides.

*Gráfico inferior (B): Inhibición de la producción de iones superóxido mediante diferentes combinaciones de bajas concentraciones óptimas de Lyc-O-Mato con ácido carnósico, luteína o beta-caroteno.*

15 La producción de iones superóxido fue inhibida (7 %) en presencia de Lyc-O-Mato (en contraste con la falta de inhibición detectable en presencia de licopeno). Las combinaciones de Lyc-O-Mato con cada uno de los otros carotenoides produjeron un bajo nivel de inhibición de la producción de iones superóxido que no era significativamente diferente del efecto del beta-caroteno o el Lyc-O-Mato.

20 De un modo similar al efecto sobre la producción de NO (véase el Ejemplo 1 anterior del presente documento), las combinaciones de Lycomato con ácido carnósico y luteína o con ácido carnósico y beta-caroteno produjeron una inhibición sinérgica significativa y similar de la producción de iones superóxido, mientras que una combinación de que excluía al ácido carnósico producía un efecto sinérgico menor.

25 Como en el caso del licopeno purificado, una combinación de ácido carnósico con los tres carotenoides no mejoraba el resultado sinérgico obtenido con la combinación mencionada anteriormente de ácido carnósico con dos carotenoides.

Estos resultados son la media  $\pm$  ETM de 3 experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado.

30

#### **Ejemplo 4**

Inhibición de la fosforilación de p65-NFκB inducida por LPS en Serina 536 en lisados nucleares de células, y de la regulación positiva de iNOS y COX2 mediante diversas combinaciones de licopeno o Lyc-O-Mato con luteína y ácido carnósico

35

#### *Introducción*

40 La expresión de proteínas enzimáticas así como de citocinas inflamatorias se puede regular mediante la activación del factor nuclear del factor de transcripción kappa (NFκB), que está implicado de una manera crítica en diversos aspectos de la patogenia de las enfermedades inflamatorias crónicas. El NFκB se activa como consecuencia de la fosforilación, ubiquitinación y posterior degradación proteolítica de la proteína IκB a través de la activación de la IκB cinasa (IKK). El NFκB liberado se transloca al núcleo y se une a motivos en los promotores de los genes pro-inflamatorios tales como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa 2 (COX2), TNF-α, y IL-1β, llevando a la inducción de la expresión de su ARNm. La mayoría de fármacos antiinflamatorios han demostrado que suprimen la expresión de estos genes inhibiendo la vía de activación del NFκB. Así pues, un inhibidor del NFκB puede ser útil como potencial fármaco terapéutico en aplicaciones clínicas para regular las enfermedades humanas asociadas a la inflamación.

50 El p65 NFκB RelA puede ser fosforilado por el PKA en Ser-276 o mediante un mecanismo sensible a cambios redox en Ser-536. Se ha demostrado que las especies reactivas del oxígeno (ROS) desempeñan un importante papel en la activación del NFκB y en la expresión de los genes inflamatorios.

55 El objetivo de este estudio era investigar si concentraciones bajas de las combinaciones licopeno/Lyc-O-Mato + luteína + ácido carnósico pueden producir una inhibición sinérgica de la activación del NFκB.

La activación del NFκB se analizó mediante sus dos formas fosforiladas: Ser-276 dependiente de PKA y Ser-536 sensible a cambios redox.

#### 60 Métodos

*Aislamiento de los macrófagos:* Se aislaron macrófagos peritoneales y se trataron tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

65 Para la detección de la activación del NFκB las células se trataron con LPS durante 10 min.

*Preparación del extracto de proteínas nucleares* - Se suspendieron  $2 \times 10^6$  células en 600  $\mu$ l de tampón de lisis NP-40 enfriado con hielo (NP-40 al 0,1 %, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, EDTA 1 mM, 10  $\mu$ g/ml de leupeptina, 10  $\mu$ g/ml de aprotonina, y PMSF 1 mM). Las células se agitaron con formación de vórtice durante 15 s, se mantuvieron en hielo durante 5 min, y se centrifugaron a 300 g durante 10 min a 4 °C. Los sedimentos resultantes (fracciones que contenían los núcleos) se solubilizaron inmediatamente en tampón de muestra de electroforesis. La integridad nuclear se verificó mediante microscopía óptica, la cual reveló también que apenas se observaban células intactas en la fracción que contenía los núcleos (< 2 %).

*Lisados celulares totales:* se prepararon usando Triton X-100 al 1 %, HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10 %, NaF 25 mM, ZnCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ M, PMSF 1 mM, y leupeptina 100  $\mu$ M.

*Análisis de transferencia de Western:* las proteínas del lisado (35-50  $\mu$ g) se separaron mediante electroforesis sobre geles de poliacrilamida con SDS al 7,5 %. Las proteínas resueltas se transfirieron mediante electroforesis a nitrocelulosa, la cual estaba teñida con rojo Ponceau para detectar la formación de bandas de proteína, y después se bloquearon en leche en TBS al 5 % (Tris 10 mM, NaCl 135 mM, pH 7,4). La determinación de la transferencia de Western se efectuó tal como se describe anteriormente (17) usando anticuerpos primarios p-P65, COX-2 e iNOS (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) para su incubación durante la noche a 4 °C, y anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón conjugados a peroxidasa producidos en cabra (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 1 hora a temperatura ambiente y se desarrollaron usando un sistema de detección de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Amersham Biosciences).

Para la detección de la transferencia de Western de p-65 las fracciones de núcleos de  $2 \times 10^6$  células se solubilizaron inmediatamente en tampón de muestra de electroforesis y se procesaron para su separación mediante electroforesis sobre gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 8 %.

### Resultados

Tal y como muestra la Fig. 10, en el análisis de transferencia de Western representativo, la adición de una combinación de licopeno 1  $\mu$ M o Lyc-O-mato 1  $\mu$ M, y ácido carnósico 2  $\mu$ M a macrófagos peritoneales durante 1 h antes de la adición de LPS durante 10 min produjo una inhibición sinérgica significativa (de aproximadamente un 80 %) de la fosforilación de p65-NF $\kappa$ B en Serina 536 en lisados nucleares de células, mientras que cada nutriente por separado no tuvo efecto alguno. La intensidad de cada banda de p-65-NF $\kappa$ B fosforilado se dividió por la intensidad de cada banda de lámina tras la cuantificación mediante densitometría, y se expresó en unidades arbitrarias. Se muestran las medias  $\pm$  ETM de tres experimentos independientes.

Tal y como se muestra en la transferencia de Western, no hubo fosforilación del p65 NF $\kappa$ B en Serina 276.

Estos resultados demuestran que la composición de polifenol-carotenoide ensayada produce una inhibición sinérgica significativa de la activación de NF $\kappa$ B mediada por la fosforilación en Ser-536, es decir, mediada por el mecanismo sensible a cambios redox.

En las mismas condiciones, la adición de las combinaciones de nutrientes (en las concentraciones detalladas anteriormente) 1 h antes de la adición de LPS durante 24 h, produjo una inhibición significativa de la expresión de las proteínas iNOS y COX2 en lisados celulares totales (Fig. 11). Cada nutriente por separado no produjo inhibición de la inducción ni de iNOS ni de COX2.

La intensidad de cada banda de proteína (iNOS o COX2) se dividió por la intensidad de cada banda de  $\beta$ -actina tras la cuantificación mediante densitometría, y se expresó en unidades arbitrarias. Se muestran las medias  $\pm$  ETM de tres experimentos independientes.

Estos resultados demuestran una inhibición sinérgica de la inducción de ambas enzimas inflamatorias a niveles de aproximadamente un 80 y aproximadamente un 60 % para iNOS y COX2, respectivamente, y confirman ambos la inhibición de la producción de NO y la liberación de PGE presentada anteriormente en el presente documento, así como una explicación molecular de la misma.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición terapéutica para su uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias en el que los iones superóxido, el NO, el TNF-alfa y/o la PGE<sub>2</sub> actúan como modulador o mediador de dicha afección mediante la inhibición o la reducción de la producción de iones superóxido, NO, TNF-alfa y/o PGE<sub>2</sub> en un sujeto humano, en donde la afección que se va a tratar se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, síndrome de insuficiencia respiratoria en el adulto (ARDS), asma, rinitis, fibrosis pulmonar idiopática, peritonitis, inflamación cardiovascular, isquemia miocárdica, lesión por reperfusión, aterosclerosis, septicemia, traumatismo, diabetes tipo II, retinopatía, psoriasis, inflamación gastrointestinal, cirrosis, peritonitis y enfermedad inflamatoria intestinal, y enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer;
- comprendiendo dicha composición terapéutica ácido carnósico y dos o más carotenoides seleccionados entre el grupo que consiste en luteína, licopeno y beta-caroteno, en donde la zeaxantina comprende hasta el 15 % del contenido de luteína, y en donde dichos componentes están presentes en los siguientes intervalos de peso:
- licopeno : luteína : beta-caroteno : ácido carnósico :
- 0,1-1,0 : 0,1-1,0 : 0,1-1,0 : 0,1-1,0 y
- en donde cada uno de los agentes activos en dicha composición terapéutica se ha de administrar en una cantidad diaria en el intervalo de 1 a 5 mg.
2. La composición terapéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha composición terapéutica comprende licopeno, luteína y ácido carnósico.
3. La composición terapéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha composición terapéutica comprende luteína, beta-caroteno y ácido carnósico.
4. La composición terapéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha composición terapéutica comprende licopeno, beta-caroteno y ácido carnósico.
5. La composición terapéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde dicha composición terapéutica comprende adicionalmente fitoeno, fitoflueno o fitoeno y fitoflueno.
6. La composición terapéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dicha composición terapéutica se administra en una forma farmacéutica.
7. La composición terapéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dicha composición terapéutica se incorpora a un alimento o una bebida.
8. La composición terapéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el ácido carnósico se usa en combinación con licopeno y luteína, el ácido carnósico se usa en combinación con licopeno y beta-caroteno o el ácido carnósico se usa en combinación con luteína y beta-caroteno.

**FIGURAS**

*Fig. 1*

**Ácido carnósico**

◆ 1  $\mu$ M

▲ 2  $\mu$ M

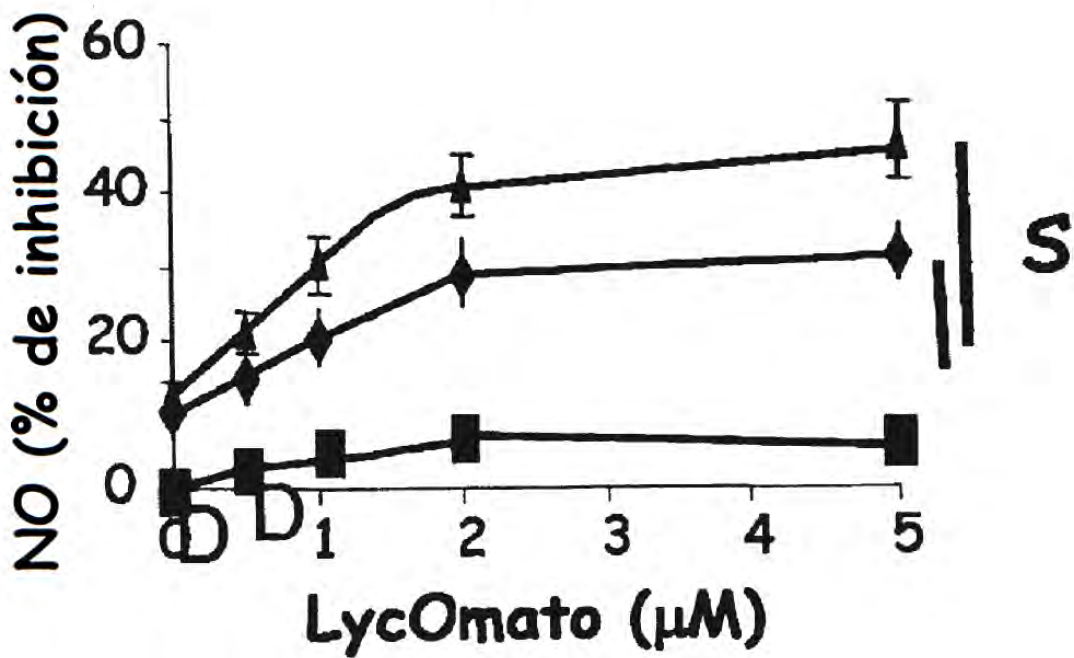
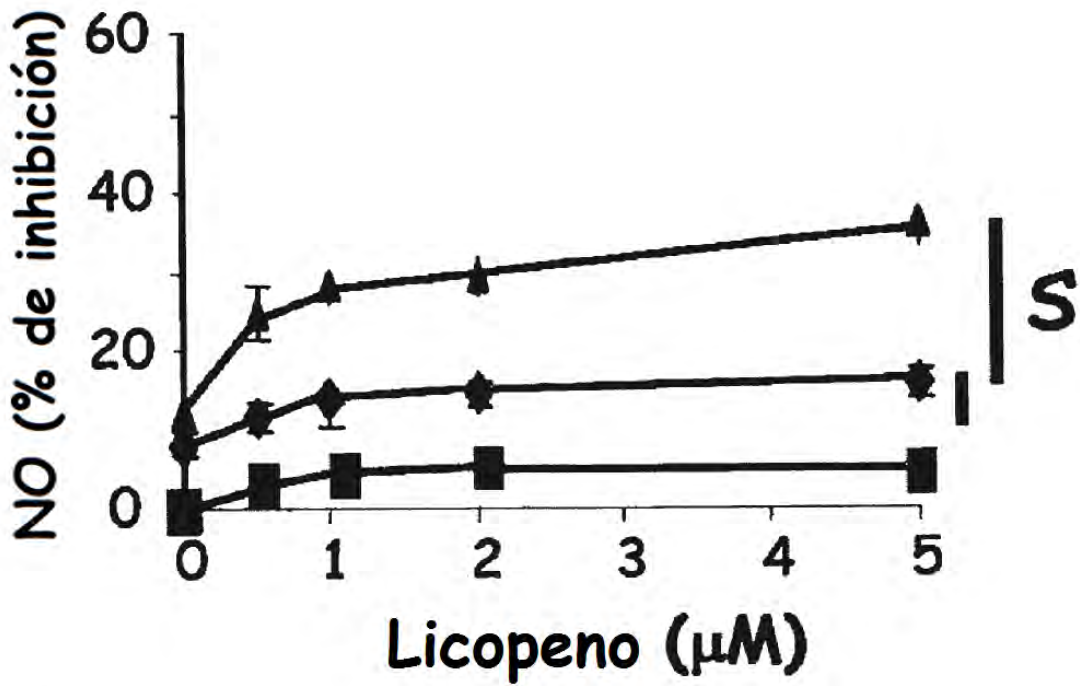




Fig. 2a

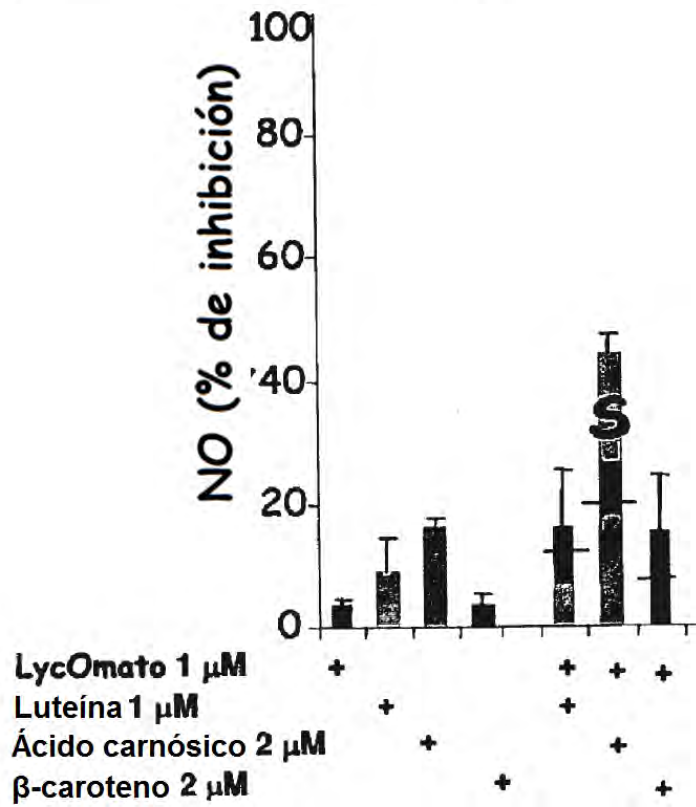
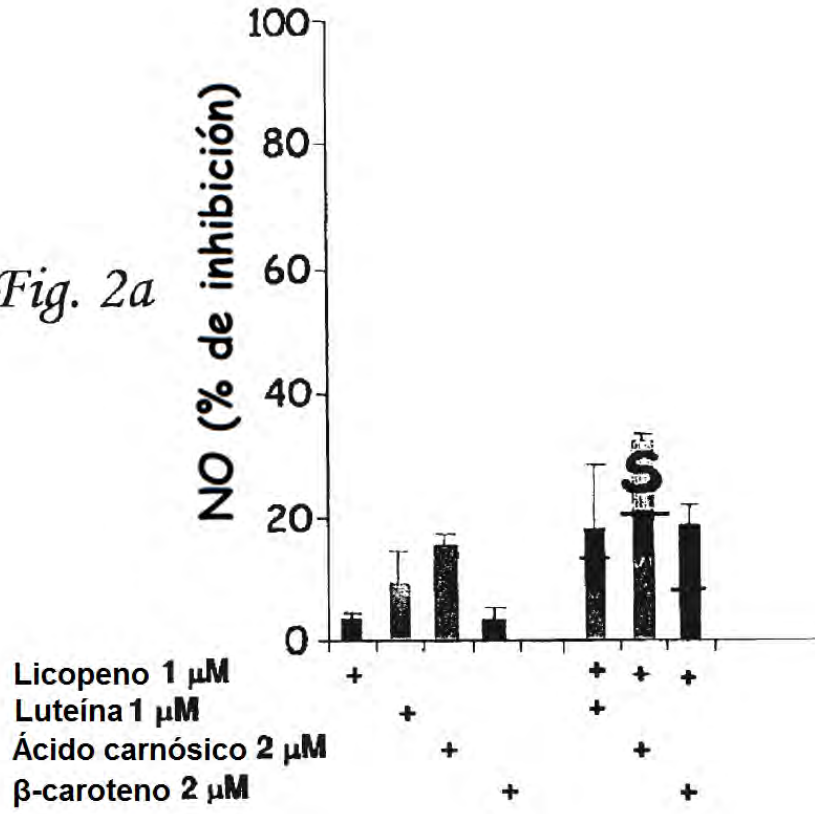


Fig. 26

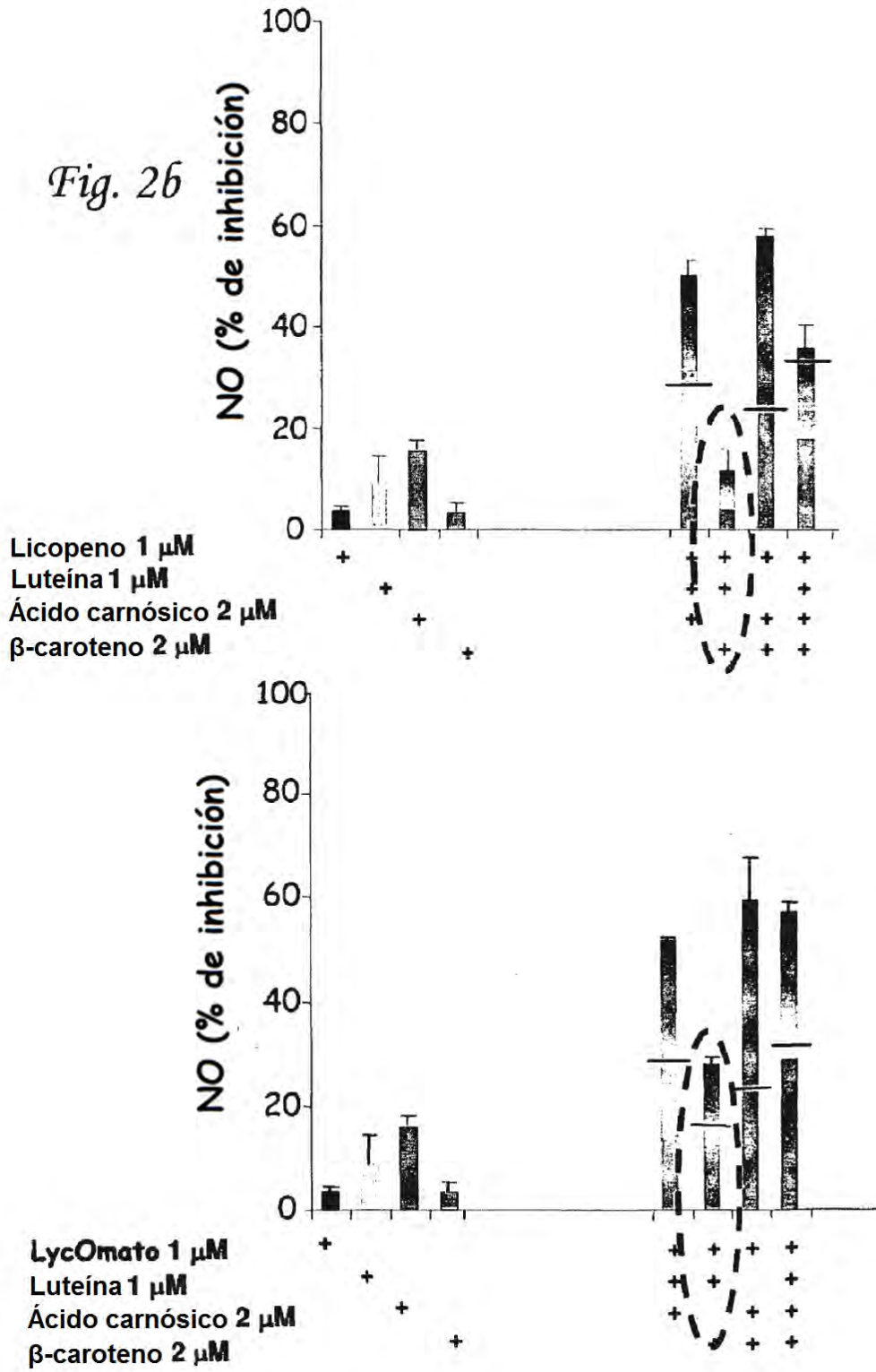
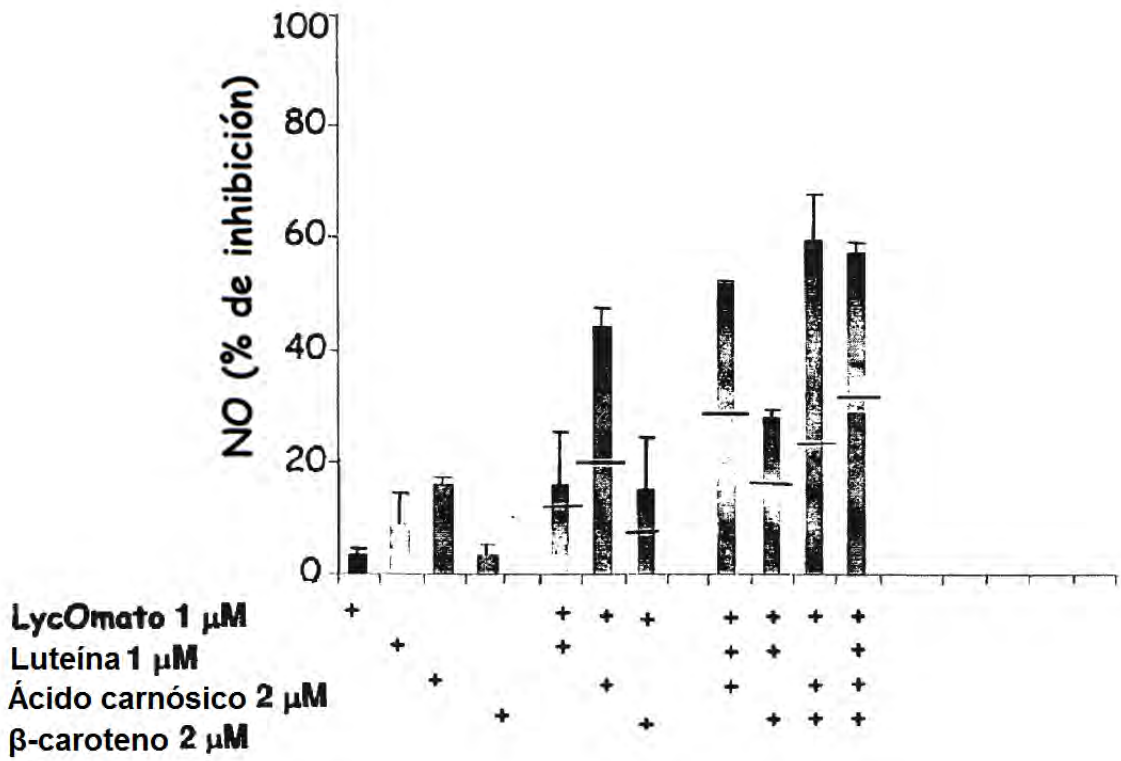
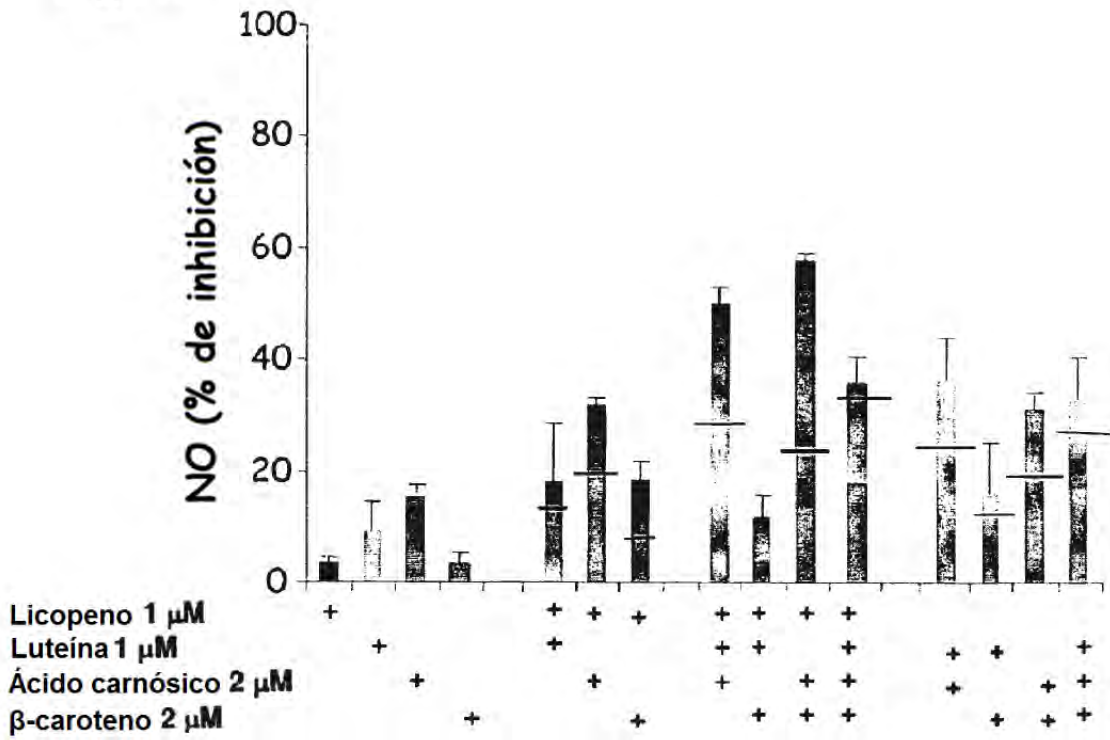
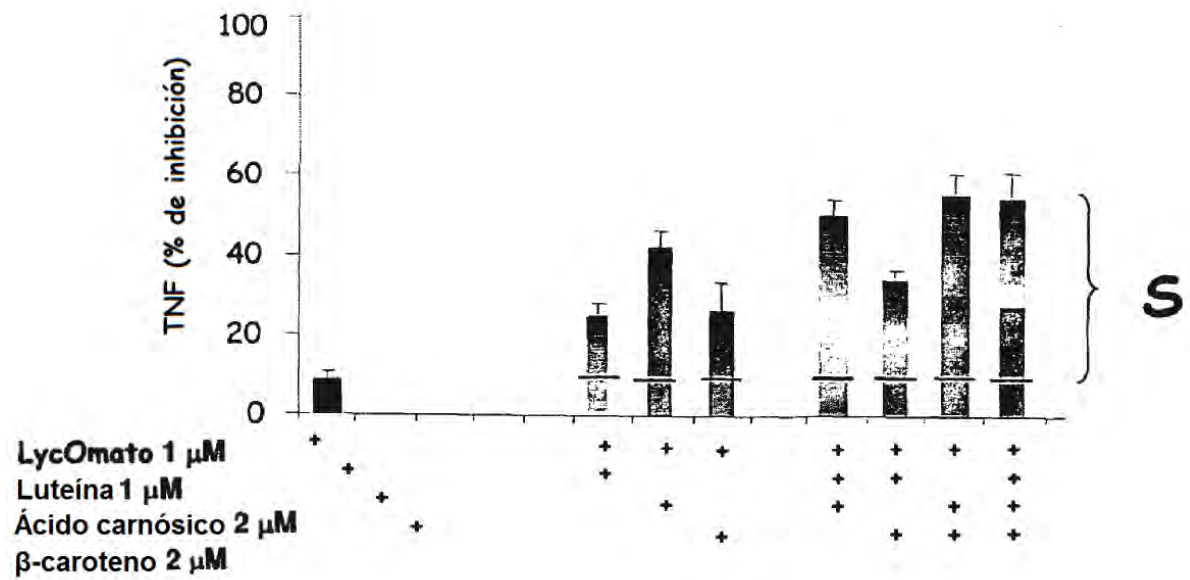
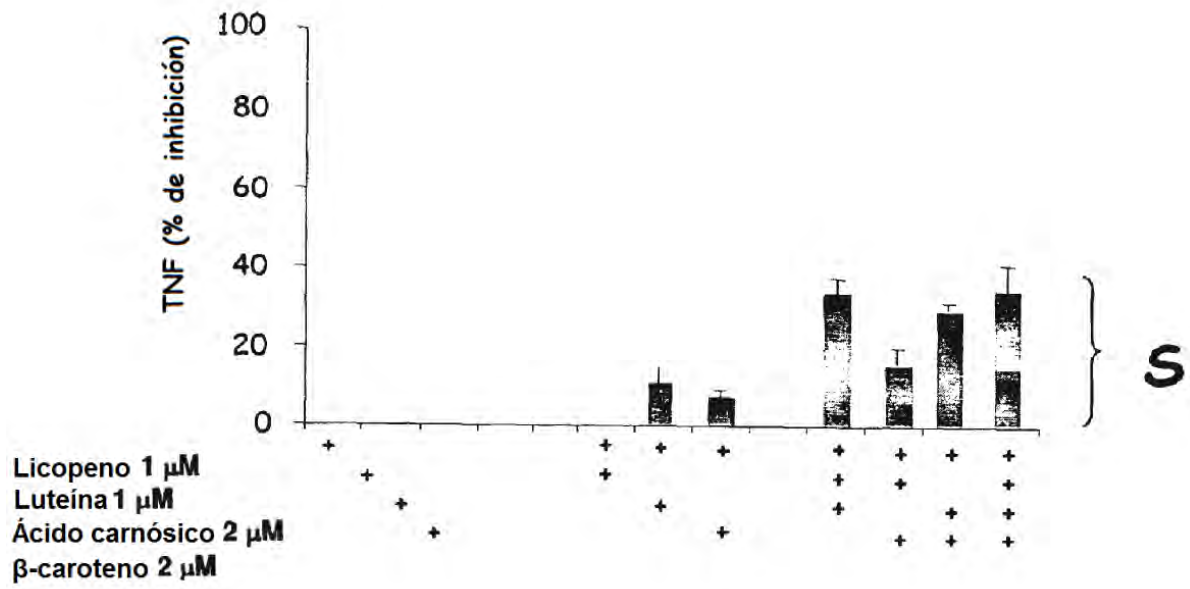


Fig. 2c



*Fig. 3*



*Fig. 4*

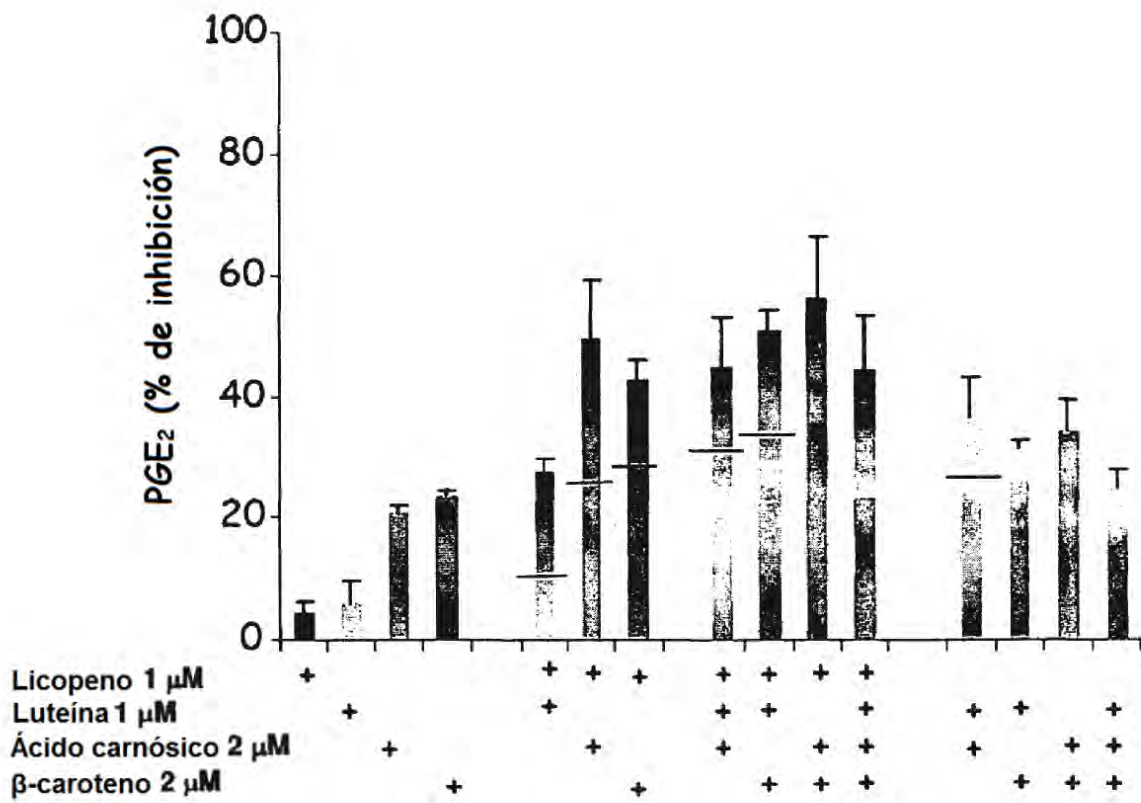


Fig. 5a

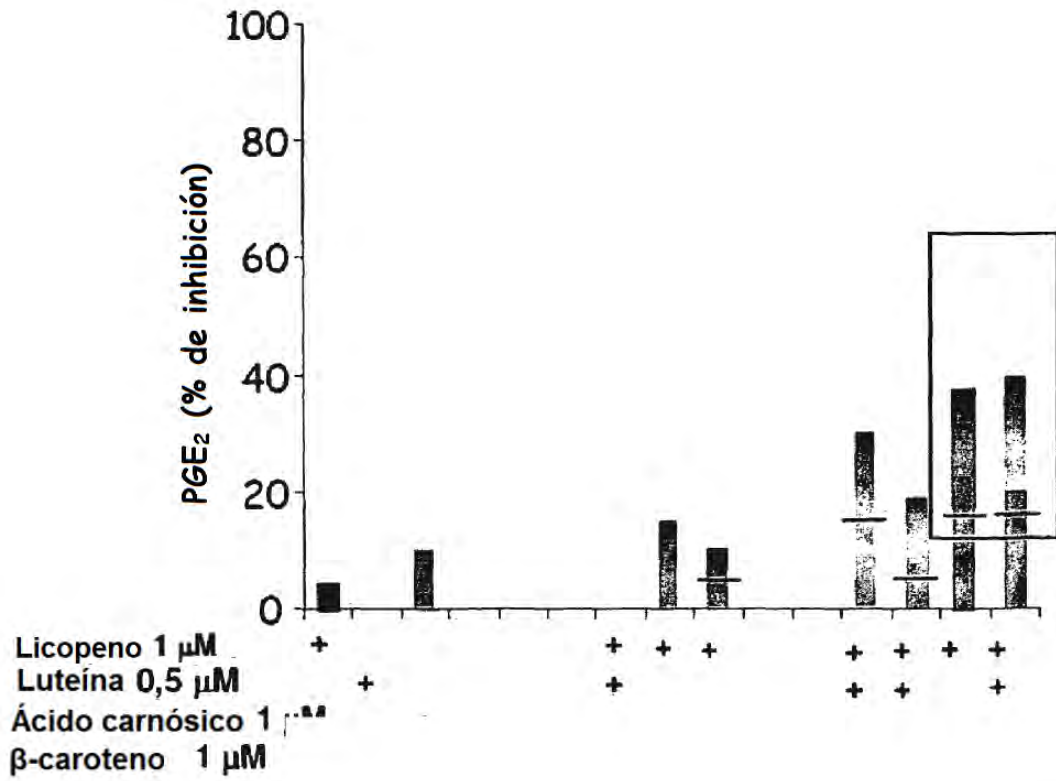
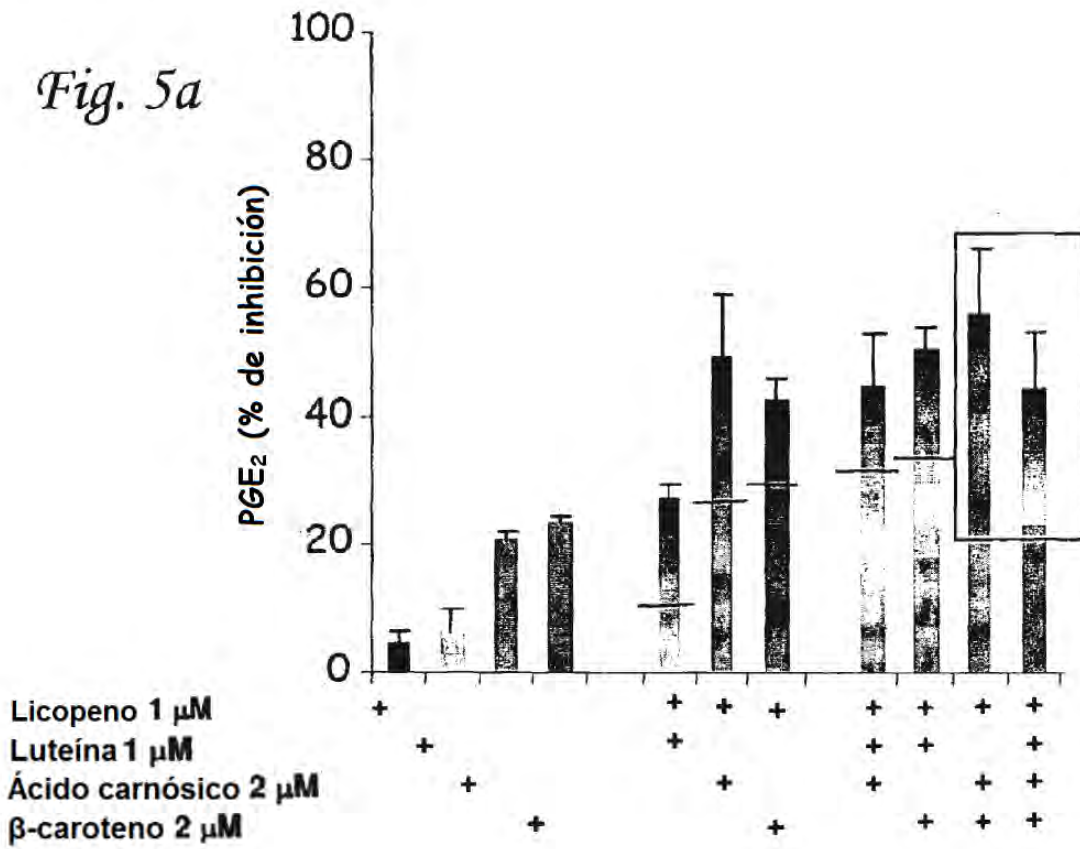


Fig. 5b

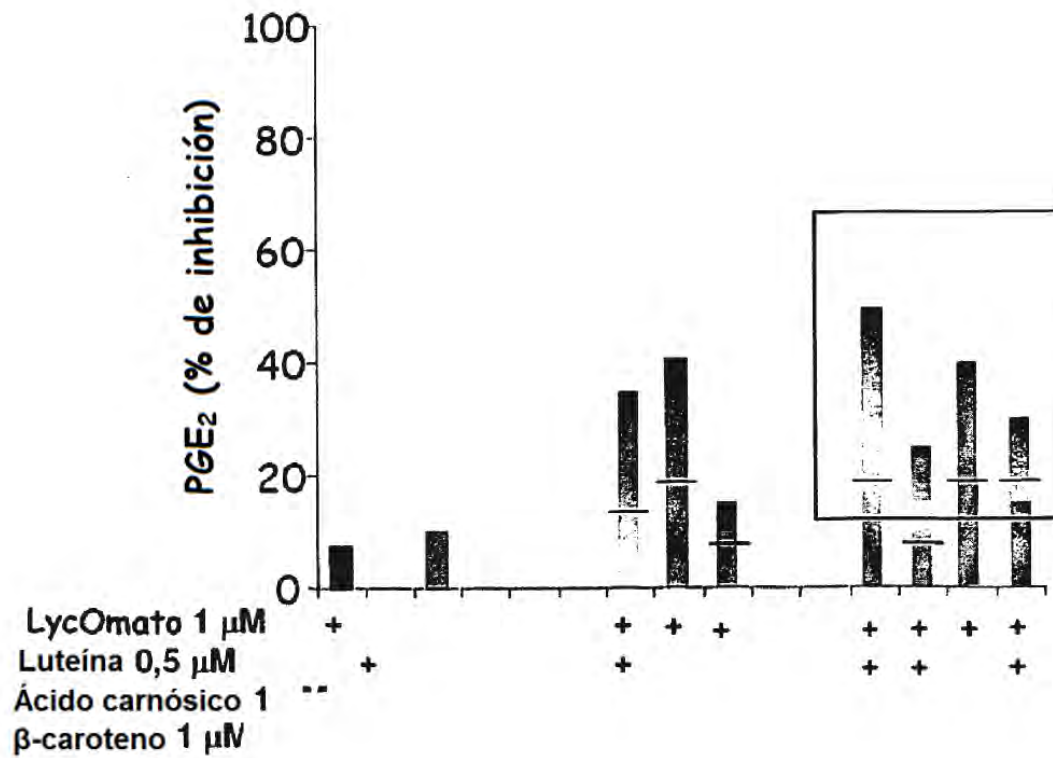
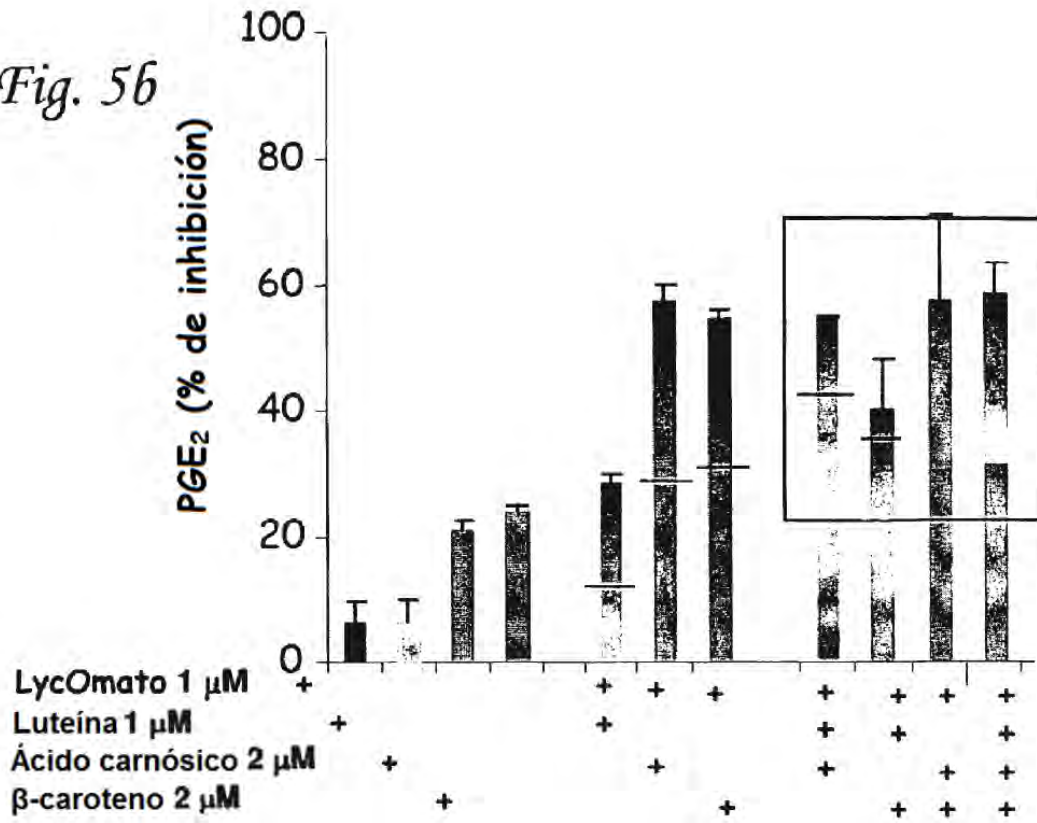


Fig. 6

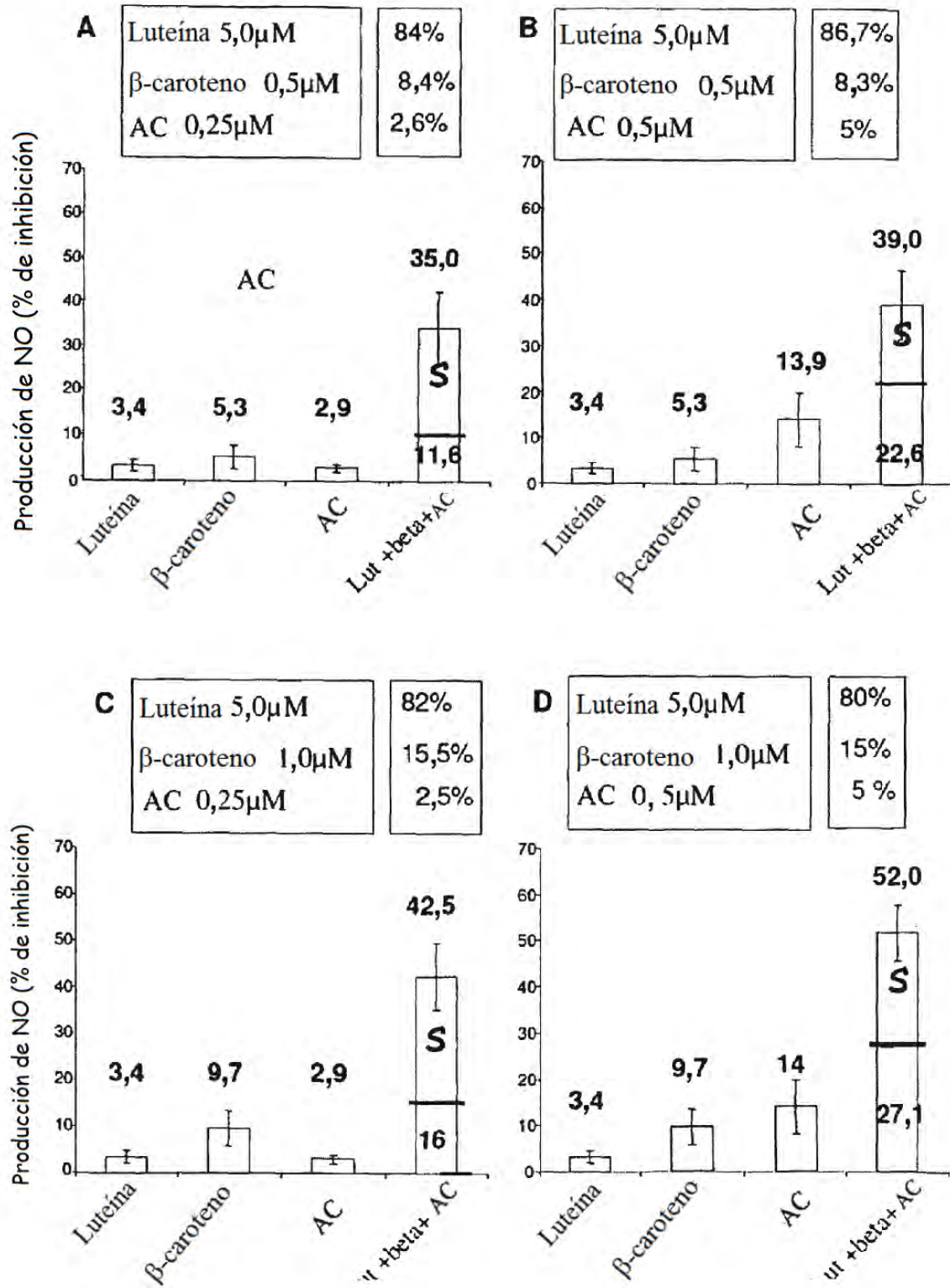




Fig. 7

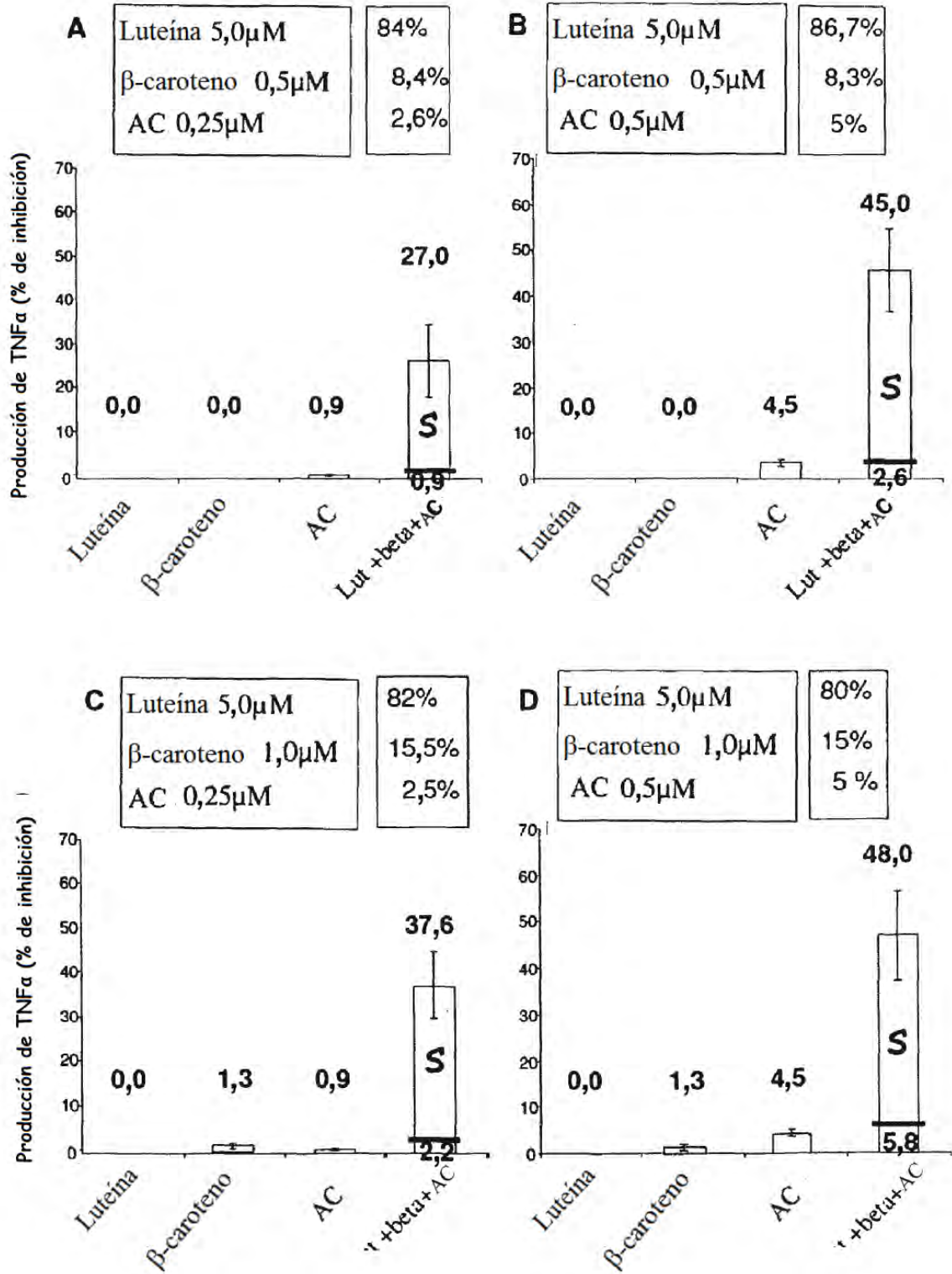


Fig. 8

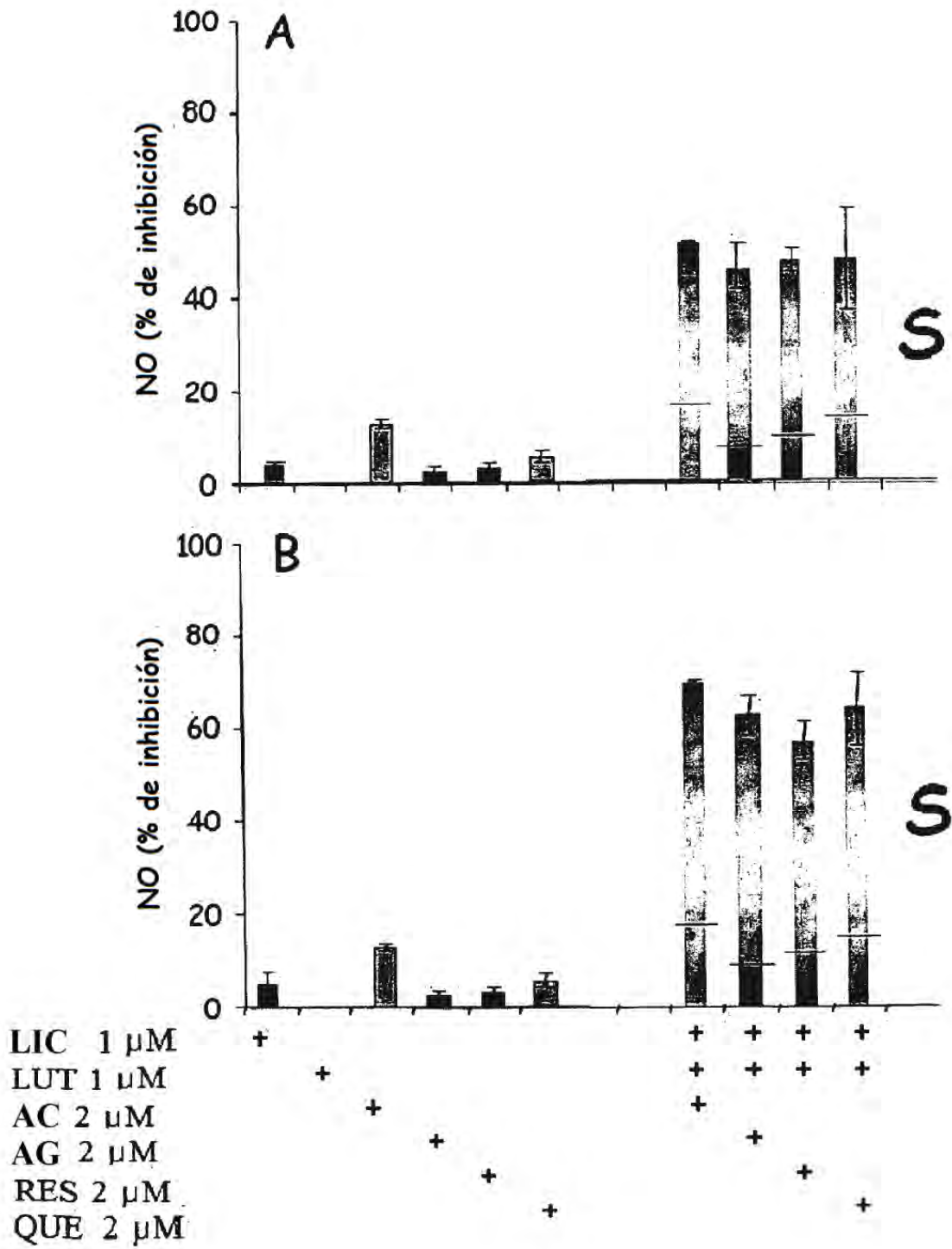


Fig. 9

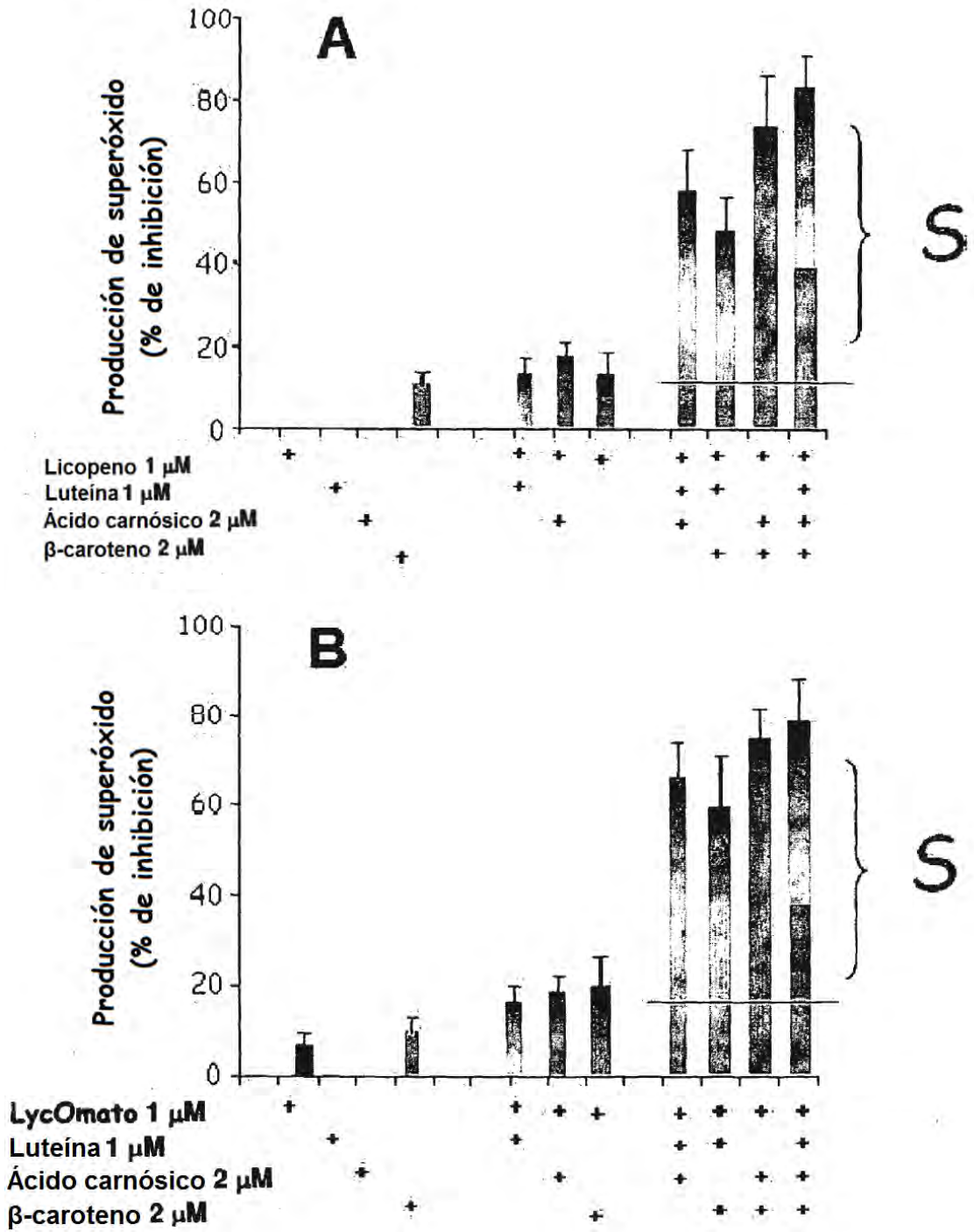


Fig. 10

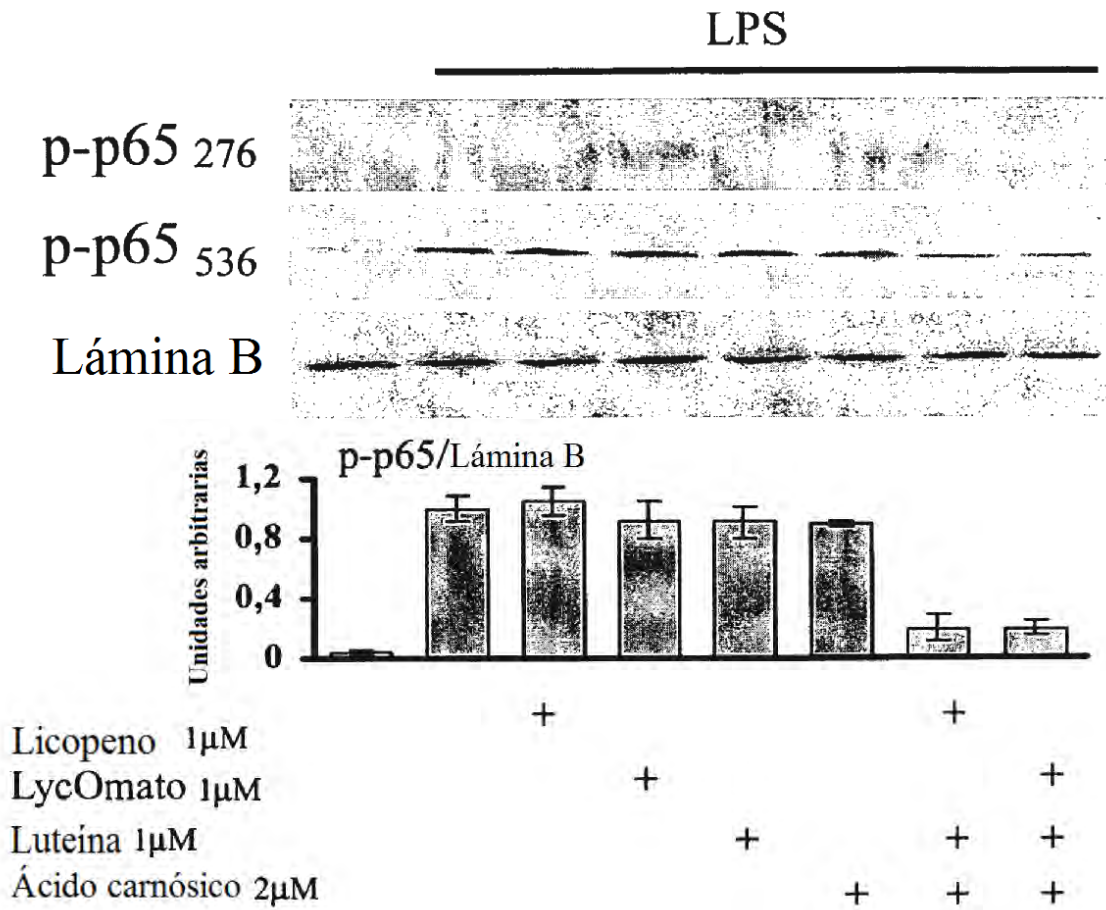


Fig. 11

