

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 158**

51 Int. Cl.:

A61K 36/81 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

A23L 33/105 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2013 PCT/US2013/037524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13163057**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2013 E 13719356 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2844083**

54 Título: **Uso del extracto de tomate como agente antihipertensivo y procedimiento para hacer un extracto de tomate libre de azúcar soluble en agua**

30 Prioridad:

23.04.2012 US 201261636813 P

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

30.11.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF OSLO (100.0%)
P.O. Box 1071, Blindern
0316 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

DUTTARROY, ASIM K.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 692 158 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

Uso del extracto de tomate como agente antihipertensivo y procedimiento para hacer un extracto de tomate libre de azúcar soluble en agua

Campo de la invención

- 5 En este documento se proporciona tecnología relacionada con extractos de tomate y, en particular, pero no exclusivamente para preparar y usar extractos de tomate como agente antihipertensivo para modular la presión arterial.

Antecedentes

- 10 La enfermedad cardiovascular es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, y, de este modo, la prevención primaria y la prevención secundaria de la enfermedad cardiovascular son prioridades de salud pública. La presión arterial alta, la hiperlipidemia y la hiperactividad de las plaquetas son los factores de riesgo reconocidos para la enfermedad cardiovascular. Entre estos, la hipertensión es reconocida como una enfermedad crónica importante. Se define como una presión arterial sistólica por encima de 140 mmHg y/o una presión arterial diastólica por encima de 90 mmHg. La hipertensión afecta hasta al 30% de la población adulta en la mayoría de los países. Sin embargo, más del 50% de los individuos hipertensos desconocen su condición. Se estima que 7.6 millones de muertes prematuras (aproximadamente el 13.5% del total mundial) y 92 millones de muertes y años de vida ajustados por discapacidad (DALYS) (6.0% del total mundial) son atribuibles a la presión arterial alta. La hipertensión no tratada puede provocar el accidente cerebrovascular, aneurisma, enfermedad coronaria (CHD), infarto de miocardio, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, hipertrofia ventricular izquierda, encefalopatía, insuficiencia cardíaca congestiva, retinopatía hipertensiva, gota, taquicardia, disfunción renal, discapacidad y muerte. Además, la hipertensión exacerba los problemas de salud asociados con la diabetes.

- 20 La hipertensión esencial no es causada por una sola causa identificable, sino por un conjunto de factores, que incluyen la herencia, la edad, el peso corporal, el entorno y la dieta. El tratamiento de la hipertensión moderada a severa es un compromiso de por vida y requiere terapia con medicamentos en combinación con cambios en el estilo de vida, incluida la reducción de peso si tiene sobrepeso, la limitación del alcohol y la reducción de la ingesta de sal y grasas. La hipertensión esencial se puede tratar con uno de varios tipos de medicamentos, incluidos los diuréticos, los bloqueadores adrenorreceptores β , los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), los bloqueadores de los canales de calcio, los bloqueadores α -adrenérgicos, los vasodilatadores y los agentes de acción central.

- 25 El sistema de renina-angiotensina es un mecanismo poderoso para controlar la presión arterial. Cuando la presión arterial disminuye, los riñones sufren varias reacciones intrínsecas que convierten la prorenina en renina. Cuando la renina ingresa al torrente sanguíneo, hidroliza el angiotensinógeno en plasma para liberar un péptido llamado angiotensina I. Cuando la angiotensina I circula a los pequeños vasos de los pulmones, se hidroliza de inmediato para liberar un péptido de 8 aminoácidos, la angiotensina II, por ACE. La angiotensina II circula en la sangre antes de ser inactivada por la angiotensinasa. La angiotensina II es un vasoconstrictor muy potente y eleva la presión arterial al constreñir severamente las arterias, causando un aumento en la resistencia periférica. También es capaz de actuar sobre los riñones para retener las sales y el agua, lo que lleva a un aumento en el volumen de líquido extracelular y, de este modo, produce un aumento en la presión arterial. Finalmente, la angiotensina II hace que las glándulas suprarrenales liberen aldosterona, que a su vez aumenta la reabsorción de agua y sal en los riñones.

- 30 De este modo, un enfoque para controlar la presión arterial es mediante el tratamiento con inhibidores de la ACE. Los inhibidores de la ACE bloquean la formación de angiotensina II, que normalmente hace que los vasos sanguíneos se estrechen y la presión arterial aumente. La ACE no es específica para convertir la angiotensina I en angiotensina II. Además de sus acciones sobre la angiotensina, la ACE también escinde una serie de otros péptidos que incluyen la bradiquinina, un nonapéptido. La bradiquinina es un potente vasodilatador dependiente del endotelio, que causa natriuresis y la consiguiente disminución de la presión arterial. Los inhibidores de la ACE no solo disminuyen la formación de angiotensina II, sino también aumenta la cantidad de bradiquinina, lo que reduce aún más la presión arterial.

Resumen

- 35 En los últimos años, ha habido un interés considerable en el potencial para usar componentes de alimentos naturales como alimentos funcionales para tratar la hipertensión, especialmente para pacientes con presión arterial límite a leve alta que no justifica la prescripción de fármacos antihipertensivos. El mecanismo por el cual algunos alimentos funcionales y nutracéuticos de tipo fenólico disminuyen la presión arterial está mediado por la inhibición y la regulación negativa de la expresión de la ACE y la renina. De acuerdo con lo anterior, en este documento se proporciona tecnología relacionada con alimentos y nutracéuticos derivados de alimentos que promueven la salud cardiovascular, por ejemplo, al actuar como agentes antihipertensivos.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende un extracto de tomate para uso como un medicamento para tratar la hipertensión en la que la composición se produce mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- a) homogeneización de los tomates;
- 5 b) eliminación de partículas por centrifugación y/o ultrafiltración; y
- c) eliminación de los azúcares solubles.

10 La tecnología se refiere a potentes inhibidores de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). Los inhibidores se derivan de los tomates y son, por ejemplo, solubles en agua, estables al calor y tienen una masa molecular inferior a 1000 Da. La modulación de la presión arterial por el extracto de tomate proporciona un beneficio profiláctico y terapéutico para prevenir y detener los procesos patológicos que conducen a la enfermedad cardiovascular. De acuerdo con lo anterior, las composiciones que comprenden el extracto de tomate descrito son útiles en la profilaxis de enfermedades cardiovasculares, por ejemplo, como un extracto de tomate terapéutico oral que se puede consumir de manera segura y eficaz para proteger el sistema cardiovascular de una persona. En particular, las composiciones de los extractos de tomate libres de azúcar proporcionadas en este documento son 15 eficaces como agentes de protección cardíaca especialmente para personas con obesidad, resistencia a la insulina y estilos de vida sedentarios.

20 En algunas realizaciones, el extracto de tomate comprende o consiste en componentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 Da. La composición puede estar esencialmente libre de licopeno y nucleósidos. La composición puede estar en forma de polvo seco, una solución que pasará a través de un filtro de 0.2 μm sin pérdida de sólidos. La composición se puede formular como una formulación oral, por ejemplo, para administración oral. Por ejemplo, la composición se puede formular en una forma seleccionada del grupo que consiste en una solución, una suspensión, un jarabe, un comprimido, una cápsula, un comprimido para deshacer en la boca, un refrigerio, una bebida saludable, un inserto y un parche.

25 La composición se puede obtener mediante un método que comprende las etapas de homogeneización de un tomate para producir un homogeneizado de tomate; filtración del homogeneizado de tomate a través de un filtro que tiene un corte de peso molecular de 1000 Da para producir un filtrado; recoger el filtrado para proporcionar un extracto; y eliminando un azúcar soluble en agua del extracto. El método también puede comprender las etapas de liofilizar el homogeneizado para producir un homogeneizado liofilizado y disolver el homogeneizado liofilizado en agua y/o liofilizar el filtrado para producir un filtrado liofilizado y disolver el filtrado liofilizado en agua.

30 Las composiciones que comprenden un extracto de tomate se pueden seleccionar del grupo que consiste en zumos, pastas, salsas y sopas. En algunas realizaciones, las composiciones son un extracto de tomate libre de azúcar, soluble en agua. La composición puede comprender un extracto de tomate hecho de una pasta de tomate de ruptura en frío. La composición se puede producir mediante un procedimiento que comprende las etapas de dilución en agua de una pasta de tomate de ruptura en frío de 28-30° Brix y un índice de pardeamiento inferior a 0.350 AU; 35 eliminación de materia particulada mayor de 0.2 μm para producir una solución; y concentración de la solución para formar un jarabe de 62-65° Brix (véase, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes Internacionales WO99/0055350, WO2007/0141495, y WO2006/085115). En algunas realizaciones, la composición se prepara mediante un método que comprende además fraccionar los componentes de los componentes libres de azúcar usando cromatografía líquida de alta presión.

40 En algunas realizaciones, el tomate se pela antes de la etapa de homogeneización. En algunas realizaciones, el extracto de tomate está en forma de un concentrado o un deshidratado. En algunas realizaciones, el extracto de tomate está en forma de un concentrado que se concentra al menos 2 veces. En algunas realizaciones, el extracto de tomate se ha deshidratado para dar un extracto seco. En algunas realizaciones, el extracto seco está en forma de una forma de dosificación sólida o semisólida. En algunas realizaciones, el extracto está contenido dentro de una 45 cubierta de cápsula. En algunas realizaciones, el extracto contiene un compuesto soluble en agua sustancialmente estable al calor o compuestos que tienen un peso molecular inferior a 1000.

50 La composición se puede usar para tratar una afección o trastorno seleccionado del grupo que consiste en el accidente cerebrovascular, aneurisma, enfermedad coronaria (CHD), ataque cardíaco, aterosclerosis, enfermedad cardíaca isquémica, hipertrofia ventricular izquierda, encefalopatía, insuficiencia cardíaca congestiva, retinopatía hipertensiva, gota, taquicardia, disfunción renal, diabetes. Las condiciones pueden estar asociadas con la actividad de la ACE y/o la hipertensión.

55 En algunas realizaciones, el extracto está en forma de una fracción activa de la fruta capaz de pasar a través de un filtro de ultrafiltración que tiene un corte de peso molecular de 1000 y que contiene un compuesto o compuestos soluble en agua, incoloro o de color pajizo o sustancialmente estable al calor que tienen un peso molecular inferior a 1000.

La composición que comprende un extracto de tomate o una fracción activa del mismo se puede seleccionar del grupo que consiste en zumos, pastas, salsas y sopas. La composición puede ser una formulación farmacéutica que comprende un extracto de tomate y un excipiente apropiado para tratar la hipertensión.

Descripción de las figuras.

- 5 La figura 1 proporciona un gráfico que representa el efecto del extracto de tomate libre de azúcar en la inhibición de la actividad de la proteína ACE pura.

Descripción detallada

- 10 En este documento se proporciona tecnología relacionada con composiciones y usos relacionados con agentes antihipertensivos en tomates. En particular, durante el desarrollo de realizaciones de la tecnología, se descubrió que los extractos de tomate libres de azúcar preparados como se describe en este documento presentan una capacidad para reducir la actividad de la ACE.

Los encabezados de sección usados en este documento tienen únicamente fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del tema descrito de ninguna manera.

- 15 En esta descripción detallada de las diversas realizaciones, con fines de explicación, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de las realizaciones descritas. Un experto en el arte apreciará, sin embargo, que estas diversas realizaciones se pueden practicar con o sin estos detalles específicos. En otros casos, las estructuras y dispositivos se muestran en forma de diagrama de bloques. Además, un experto en el arte puede apreciar fácilmente que las secuencias específicas en las que se presentan y realizan los métodos son ilustrativas y se contempla que las secuencias pueden variarse y aún permanecer dentro del espíritu y alcance de las diversas realizaciones descritas en este documento.

- 20 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en el arte al que pertenecen las diversas realizaciones descritas en este documento. Cuando las definiciones de los términos en las referencias incorporadas parecen diferir de las definiciones proporcionadas en las presentes instrucciones, prevalecerá la definición provista en las presentes instrucciones.

- 25 Se apreciará que existe una implicación de "aproximadamente" antes de las temperaturas, concentraciones, tiempos, etc. discutidos en las presentes instrucciones, de modo que las desviaciones leves e insustanciales están dentro del alcance de las presentes instrucciones. En esta aplicación, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. También, el uso de "comprenden", "comprende", "que comprende", "contienen", "contiene", "que contiene", "incluyen", "incluye", y "que incluye" no pretende ser limitativo. Se debe entender que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solo de ejemplo y explicativas y no son restrictivas de las presentes instrucciones.

- 30 Además, a menos que el contexto lo requiera, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular y química e hibridación de oligo o polinucleótidos descritas en este documento son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Las técnicas estándar se usan, por ejemplo, para la purificación y preparación de ácidos nucleicos, análisis químico, ácido nucleico recombinante y síntesis de oligonucleótidos. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en este documento. Las técnicas y procedimientos descritos en este documento se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2000). Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio descritos en este documento son los bien conocidos y comúnmente usados en la técnica.

Definiciones

Para facilitar una comprensión de la tecnología actual, a continuación se definen un número de términos y frases. Definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

- 50 A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, los siguientes términos toman los significados explícitamente asociados en este documento, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La frase "en una realización" como se usa en este documento no se refiere necesariamente a la misma realización, aunque puede hacerlo. Adicionalmente, la frase "en otra realización", como se usa en este documento, no se refiere necesariamente a una realización diferente, aunque puede ser así. De este modo, como se describe a continuación, diversas realizaciones de la invención se pueden combinar fácilmente, sin apartarse del alcance o espíritu de la invención.

- Además, como se usa en este documento, el término "o" es un operador inclusivo "o" y es equivalente al término "y/o" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "basado en" no es exclusivo y permite basarse en factores adicionales que no se describen, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, a lo largo de la memoria descriptiva, el significado de "un", "uno" y "el" incluye referencias plurales. El significado de "en" incluye "en" y "sobre".
- 5
- Como se usa en este documento, el término "soluble en agua" aplicado a un extracto de tomate se refiere a que el extracto de tomate es soluble a temperatura ambiente, por ejemplo, a aproximadamente 25 °C. Sin embargo, esta definición no es limitante, ya que algunas composiciones que comprenden extractos según la tecnología son solubles a temperaturas más bajas, por ejemplo, a temperaturas tan bajas como aproximadamente 4 °C.
- 10
- Como se usa en este documento, el término "activo" aplicado a una composición, extracto, sustancia, mezcla, sólido, líquido, etc., se refiere a tener la capacidad de modular (por ejemplo, disminuir) la presión arterial y/o modular (por ejemplo, inhibir) la actividad de la ACE.
- Un "sujeto" es un animal, tal como un vertebrado, y preferiblemente un mamífero, tal como un ser humano. Se entiende que mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, simios, humanos, bovinos, cérvidos, equinos, porcinos, caninos, felinos, etc.
- 15
- Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones.
- Como se usa en este documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una composición suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones, aplicaciones o dosis y no se pretende limitarla a una formulación o vía de administración particular.
- 20
- Como se usa en este documento, el término "coadministración" se refiere a la administración de al menos dos agentes o terapias a un sujeto. En algunas realizaciones, la coadministración de dos o más agentes o terapias es concurrente. En otras realizaciones, un primer agente/terapia se administra antes de un segundo agente/terapia. Los expertos en el arte entienden que las formulaciones y/o rutas de administración de los diversos agentes o terapias usadas pueden variar. La dosis apropiada para la coadministración puede ser determinada fácilmente por un experto en el arte. En algunas realizaciones, cuando se coadministran agentes o terapias, los agentes o terapias respectivos se administran en dosis más bajas que las apropiadas para su administración sola. De este modo, la coadministración es especialmente deseable en realizaciones en las que la coadministración de los agentes o terapias reduce la dosis requerida de un agente potencialmente dañino (por ejemplo, tóxico).
- 25
- Como se usa en este documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo con un portador, inerte o activo, haciendo que la composición sea especialmente apropiada para uso terapéutico.
- 30
- Los términos "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable", como se usan en este documento, se refieren a composiciones que no producen sustancialmente reacciones adversas, por ejemplo, reacciones tóxicas, alérgicas o inmunológicas, cuando se administran a un sujeto. Las composiciones farmacéuticamente aceptables son conocidas en la técnica, tales como las descritas en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985), incorporadas explícitamente en este documento como referencia para todos los fines.
- 35
- Como se usa en este documento, el término "que trata" incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una enfermedad o trastorno mediante la introducción de cualquier manera de una composición terapéutica de la presente tecnología en o sobre el cuerpo de un sujeto. "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en la que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico objetivo. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en quienes se debe prevenir el trastorno.
- 40
- Como se usa en este documento, "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico suficiente para producir un efecto clínico beneficioso o deseado. Dicha dosis se puede administrar en una o más administraciones. Sin embargo, la determinación precisa de lo que se consideraría una dosis eficaz se puede basar en factores individuales para cada paciente, que incluyen, pero no se limitan a, la edad del paciente, el tamaño, el tipo o la extensión de la enfermedad, la etapa de la enfermedad y la vía de administración, el tipo o la extensión de la terapia complementaria usada, el procedimiento de la enfermedad en curso y el tipo de tratamiento deseado (por ejemplo, tratamiento agresivo versus tratamiento convencional).
- 45
- Realizaciones de la tecnología.
- Aunque la descripción en este documento se refiere a ciertas realizaciones ilustradas, se debe entender que estas realizaciones se presentan a modo de ejemplo y no a modo de limitación.
- 50
- 55 Extractos de tomate

En este documento se proporcionan extractos de tomate que tienen actividades que son beneficiosas para la salud cardiovascular. Por ejemplo, los datos recopilados durante el desarrollo de realizaciones particulares de la tecnología descrita muestran que el extracto redujo la actividad de la ACE en el suero normal de una manera dependiente de la dosis. Además, los datos recopilados también demuestran que los compuestos activos en el extracto de tomate son solubles en agua y tienen una estructura muy diferente a la de los compuestos solubles en lípidos. El extracto se puede fraccionar para aislar una o más fracciones activas en este mediante, por ejemplo, filtración de peso molecular o cromatografía en un soporte apropiado. En algunas realizaciones, el fraccionamiento, por ejemplo, usando una columna Lipidex-1000, da como resultado la eliminación de lípidos. En algunas realizaciones, el extracto se fracciona por extracción en fase sólida. Durante el desarrollo de la tecnología provista, los experimentos llevados a cabo en extracto de tomate revelaron que los componentes activos del extracto pasan a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un corte de peso molecular de 1000 Da. Además, el extracto activo es incoloro, soluble en agua y no pierde actividad cuando se hierve. En algunas realizaciones, el compuesto activo en el extracto no es licopeno.

La tecnología abarca composiciones que comprenden realizaciones de los extractos producidos como se describe en los ejemplos y como se describe, por ejemplo, en las Publicaciones de Patentes Internacionales WO/1999/0055350, WO/2007/0141495; y WO/2006/085115 incorporadas en este documento como referencia en su totalidad para todos los fines. Además, la tecnología abarca composiciones, métodos de producción de composiciones, formulaciones farmacéuticas y otra tecnología descrita, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,958,164; EP 1334728; AU 772923; y DK 1083912. La tecnología abarca modificaciones de las composiciones, métodos y tecnologías proporcionadas en estas publicaciones que son obvias para un experto en el arte.

Por ejemplo, debido a la presencia en los tomates de los agentes anti-ACE y/o antihipertensivos, algunas realizaciones de la tecnología comprenden el uso de tomates enteros, picados, en puré, en rodajas o en otras formas no fraccionadas. (jugos, pastas, salsas, sopas, guarniciones, etc.) para reducir la presión arterial o inhibir la ACE. En realizaciones preferidas, estas diversas formas comprenden una fracción activa que reduce la presión arterial y/o inhibe la actividad de la ACE en una población diana (esto es, personas que necesitan reducción de la presión arterial o que necesitan tratamiento de enfermedades asociadas con una mayor actividad de la ACE). De este modo, mientras que los tomates enteros o los tomates que han sido picados o triturados de otra manera pero no fraccionados pueden usarse para los propósitos de la invención, en algunas realizaciones, un extracto de tomate para reducir la presión arterial y/o inhibir la actividad de la ACE es un extracto acuoso de tomate. Tales extractos se pueden preparar homogeneizando la carne de un tomate, con o sin su piel, y luego filtrando el homogeneizado para eliminar los sólidos. Preferiblemente, se eliminan sustancialmente todos los sólidos insolubles en agua, por ejemplo, mediante centrifugación y/o filtración.

En cada caso, la eliminación de los sólidos tiene el efecto de eliminar fragmentos de piel que contienen licopeno. De este modo, en algunas realizaciones, los extractos de tomate abarcados por la tecnología son extractos solubles en agua que están sustancialmente libres de licopeno. El filtrado acuoso se puede someter a un fraccionamiento adicional para proporcionar una fracción activa que contiene un compuesto o compuestos responsables de los efectos biológicos o terapéuticos descritos en este documento. Alternativamente, el filtrado se puede evaporar para dar un extracto seco soluble en agua. La filtración del homogeneizado de tomate se puede realizar en una sola etapa, o en una serie de etapas de filtración, comenzando con una etapa de filtración o centrifugación relativamente gruesa para eliminación de partículas más grandes de la piel de tomate y/u otros fragmentos insolubles en agua de la carne de tomate. Algunas realizaciones proporcionan que los tomates se pelan como una primera etapa para eliminar una gran parte de la piel del tomate antes de la homogeneización. Luego se pueden usar etapas de filtración adicionales para producir una solución sustancialmente clara, por ejemplo, una solución que pasará a través de un filtro de 0.2 μm sin pérdida de sólidos.

De este modo, en realizaciones de la tecnología, el extracto de tomate es un extracto soluble en agua sustancialmente libre de licopeno y capaz de pasar a través de un filtro de 0.2 μm sin pérdida de sólidos. Además, en algunas realizaciones, los azúcares nativos se eliminan de los extractos de tomate. Una ventaja de eliminar los azúcares es que la actividad de los extractos se concentra y los extractos tienden a ser menos pegajosos y más fáciles de procesar en forma sólida.

Alternativamente, se pueden usar pastas de tomate disponibles comercialmente como material de partida para la preparación de los extractos. Las pastas de tomate se diluyen por lo general con agua y luego se eliminan los sólidos insolubles en agua, por ejemplo, mediante centrifugación y/o filtración para dar una solución sustancialmente clara. Cuando el material de partida para la preparación de los extractos es una pasta de tomate, es preferiblemente uno que se haya producido por medio de un procedimiento de "ruptura en frío" en lugar de un procedimiento de "ruptura en caliente". Los términos "ruptura en frío" y "ruptura en caliente" son bien conocidos en el campo del procesamiento de tomate y las pastas de tomate disponibles comercialmente se venden por lo general como pastas ya sea de ruptura en caliente o de ruptura en frío. Las pastas de ruptura en frío se pueden preparar mediante un procedimiento que implica la homogeneización del tomate, seguido de una etapa de procesamiento térmico en el que los tomates se calientan a una temperatura de no más de aproximadamente 60 °C, en contraste con las pastas

de ruptura en caliente donde los tomates homogeneizados son sometidos a procesamiento térmico a temperaturas de aproximadamente 95 °C (véase, por ejemplo, Anthon et al., J. Agric. Food Chem. 2002, 50: 6153-6159).

5 En algunas realizaciones, un extracto acuoso de tomate o pasta de tomate se produce por digestión enzimática de pectinas y almidón en fruta o pasta homogeneizada, seguido de la eliminación de sólidos suspendidos del
 10 homogeneizado y micro o ultrafiltración para eliminar unas proteínas de gran peso molecular y polisacáridos restantes. El extracto se puede refinar eliminando azúcares simples, por ejemplo, glucosa, fructosa y sacarosa, dejando un extracto concentrado soluble en agua que contiene una amplia variedad de componentes de tomate libres de azúcar de bajo peso molecular (<1000 Da). La eliminación de azúcares simples se puede llevar a cabo mediante cristalización, por ejemplo, usando cristalización asistida por ultrasonido a baja temperatura o precipitación
 15 con etanol de glucosa cristalina y fructosa. Alternativamente, los azúcares simples se pueden separar de otros componentes del extracto mediante un procedimiento cromatográfico, por ejemplo, la adsorción selectiva de los componentes del extracto bioactivo de la solución acuosa en un material de resina a base de poliestireno, permitiendo de este modo la eliminación selectiva de glucosa, fructosa y sacarosa en el flujo de residuos. Los compuestos libres de azúcar adsorbidos se recuperan luego del material de resina adsorbente por elución con
 20 etanol, seguido de la eliminación del etanol por evaporación. Los componentes libres de azúcar se pueden secar en un polvo soluble en agua por secado por pulverización o secado en tambor u, opcionalmente, resuspenderse en agua para dar un jarabe acuoso. Los extractos acuosos preparados son proporcionados por realizaciones de la tecnología. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los extractos son polvos secos, un concentrado, un deshidratado, un semisólido, etc. Los concentrados son, en algunas realizaciones, concentrados al menos 2 veces, concentrados al menos 4 veces, concentrados al menos 8 veces, al menos 40 veces, al menos 100 veces, al menos 200 veces o al menos 1000 veces.

25 Los extractos de tomate libres de azúcar, por ejemplo, extractos como se describen en este documento, por lo general contienen una variedad de compuestos de peso molecular <1000 Da y se proporcionan en este documento como realizaciones para uso según la tecnología descrita. Adicionalmente, los extractos de tomate son eficaces si no tienen o tienen un bajo contenido de nucleósidos. De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, el extracto de tomate que encuentra uso de acuerdo con la tecnología tiene no menos de nucleósidos 10 nM contenidos en el mismo.

30 Los extractos de tomate abarcados por la tecnología comprenden un número de componentes bioactivos, por ejemplo, compuestos fenólicos, aminoácidos, conjugados de aminoácidos y compuestos de sabor de tomate. En algunas realizaciones, los extractos comprenden compuestos fenólicos seleccionados de flavonoides y derivados de flavonoides, por ejemplo, derivados de quercetina, kaempferol y naringenina; ácidos hidroxicinámicos y derivados, por ejemplo, ácido ferúlico, ácido cumárico y sus conjugados; ácidos benzoicos y derivados tales como ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido salicílico y conjugados. En algunas realizaciones, el extracto comprende aminoácidos seleccionados de tirosina e hidroxitirosina, fenilalanina, glutamina y sus conjugados. En
 35 algunas realizaciones, los extractos comprenden un compuesto de sabor tal como un derivado de hexanal, sulfuro de dimetilo, beta-damascenona, ácido 3-metilbutírico, eugenol y/o metional.

En algunas realizaciones, los extractos de tomate están subfraccionados por HPLC para producir tres subfracciones en base a la polaridad.

Fórmulas farmacéuticas y nutracéuticas.

40 Los extractos o fracciones activas de los mismos se pueden formular para administración oral. Como tales, se pueden formular como, por ejemplo, soluciones, suspensiones, jarabes, comprimidos, cápsulas, comprimidos para deshacer en la boca, barras de aperitivos, inserciones y parches. Tales formulaciones se preparan de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los extractos o fracciones activas se forman en jarabes u otras soluciones para administración por vía oral. Como una realización de ejemplo de una
 45 composición administrable por vía oral, la tecnología contempla, por ejemplo, bebidas saludables, que comprenden opcionalmente uno o más excipientes seleccionados de azúcares, vitaminas, agentes aromatizantes, agentes colorantes, conservantes y espesantes. En algunas realizaciones, se añaden agentes de ajuste de tonicidad tales como cloruro de sodio o un azúcar para proporcionar una solución de una fuerza osmótica particular, por ejemplo una solución isotónica. Uno o más agentes de ajuste de pH, tales como agentes reguladores, también se usan en
 50 algunas realizaciones para ajustar el pH a un valor particular y, por ejemplo, mantenerlo en ese valor. Los ejemplos de agentes reguladores incluyen soluciones reguladoras de citrato de sodio/ácido cítrico y soluciones reguladoras de fosfato.

55 En algunas realizaciones, los extractos o fracciones activas de los mismos se secan, por ejemplo, mediante secado por pulverización o secado por congelación, y el producto secado formulado en una forma de dosificación sólida o semisólida, por ejemplo, como un comprimido, comprimido para deshacer en la boca, cápsula, polvo, granulado o gel. Por ejemplo, los extractos secados simples se preparan según realizaciones particulares de la tecnología sin ningún componente adicional. Alternativamente, algunas realizaciones proporcionan extractos secos que se preparan por adsorción sobre un soporte sólido, por ejemplo, un azúcar tal como sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, manosa; un alcohol de azúcar tal como xilitol, sorbitol o manitol; o un derivado de celulosa. Otros

adsorbentes particularmente útiles incluyen adsorbentes basados en almidón, tales como harinas de cereales, por ejemplo, harina de trigo y harina de maíz.

5 Para la formación de comprimidos, el extracto seco se mezcla por lo general con un diluyente tal como un azúcar, por ejemplo, sacarosa o lactosa; alcoholes de azúcar tales como xilitol, sorbitol y manitol; o celulosa modificada o derivado de celulosa tal como celulosa en polvo, celulosa microcristalina o carboximetilcelulosa. Los comprimidos también contendrán por lo general uno o más excipientes seleccionados de agentes de granulación, aglutinantes, lubricantes y agentes desintegrantes. Los ejemplos de desintegrantes incluyen almidón y derivados de almidón, y otros polímeros hinchables, por ejemplo, desintegrantes poliméricos reticulados tales como carboximetilcelulosa reticulada, polivinilpirrolidona reticulada y glicolatos de almidón. Los ejemplos de lubricantes incluyen estearatos tales como estearato de magnesio y ácido esteárico. Los ejemplos de aglutinantes y agentes de granulación incluyen polivinilpirrolidona. Cuando el diluyente no es naturalmente muy dulce, se puede añadir un edulcorante, por ejemplo, glicirricinato de amonio o un edulcorante artificial tal como aspartamo o sacarinato de sodio.

15 En algunas realizaciones, los extractos secos se formulan como polvos, gránulos o semisólidos para su incorporación en cápsulas. Por ejemplo, en relación con las realizaciones en forma de polvos, los extractos se formulan junto con uno cualquiera o más de los excipientes definidos anteriormente en relación con los comprimidos, o pueden presentarse en forma no diluida. Por ejemplo, en relación con las realizaciones en forma de un semisólido, los extractos secos se disuelven o suspenden en un líquido viscoso o vehículo semisólido tal como un polietilenglicol, o un portador líquido tal como un glicol, por ejemplo, propilenglicol, glicerol, o un aceite vegetal o de pescado, como un aceite seleccionado de aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de onagra, aceite de soja, aceite de hígado de bacalao, aceite de arenque, etc. Tales extractos se pueden rellenar en cápsulas de ya sea tipo de gelatina dura o de gelatina blanda o hechas de equivalentes de gelatina dura o blanda.

20 En algunas realizaciones, los extractos secos se proporcionan en forma de polvo para su incorporación en barras de aperitivos tales como barritas de fruta, barritas de nueces y barritas de cereales. Por ejemplo, en relación con las realizaciones en forma de una barra de aperitivos, los extractos secos se mezclan con uno o más ingredientes seleccionados de frutas secas como tomates secados al sol, pasas y sultanas; o cacahuetes o cereales tales como la avena y el trigo.

25 En algunas realizaciones, los extractos secos se proporcionan en forma de polvo para la reconstitución como una solución. Como tales, también pueden contener excipientes solubles tales como azúcares, agentes reguladores tales como las soluciones reguladoras de citrato y fosfato, y agentes efervescentes formados a partir de carbonatos, por ejemplo, bicarbonatos tales como el bicarbonato de sodio o amonio, y un ácido sólido, por ejemplo, ácido cítrico o sal ácida de citrato. En algunas realizaciones, el extracto seco se proporciona en forma de polvo opcionalmente junto con un excipiente sólido preferido (por ejemplo, en polvo) para su incorporación en cápsulas, por ejemplo, una cápsula de gelatina dura. En algunas realizaciones, el extracto seco es uno del cual se han eliminado sustancialmente todos los azúcares nativos. En realizaciones de ejemplo, una forma de dosificación sólida o semisólida relacionada con la tecnología contiene hasta aproximadamente 1000 mg del extracto seco, por ejemplo, hasta aproximadamente 800 mg. Los extractos se presentan en algunas realizaciones como suplementos alimenticios o aditivos alimentarios, o se pueden incorporar a alimentos, por ejemplo, alimentos funcionales o nutracéuticos.

30 En algunas realizaciones de la tecnología, las composiciones se proporcionan en forma de formas de dosificación unitaria que contienen una concentración definida de extracto o fracción activa del mismo. Tales formas de dosificación unitaria se pueden seleccionar para alcanzar un nivel deseado de actividad biológica. Por ejemplo, una forma de dosificación unitaria puede contener una cantidad de hasta 1000 mg (peso seco) de un extracto o fracción activa, más por lo general hasta 800 mg, por ejemplo 50 mg a 800 mg, por ejemplo, 100 mg a 500 mg. Las cantidades particulares de extracto o fracción activa que pueden incluirse en una forma de dosificación unitaria se pueden seleccionar entre 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg y 800 mg. Además, las composiciones pueden incluirse en un contenedor, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Usos farmacéuticos y nutracéuticos.

35 La cantidad de extracto o fracción activa administrada a un paciente por día dependerá de la potencia del extracto y la condición o enfermedad particular en tratamiento y su gravedad, y en última instancia, será a discreción del médico. Sin embargo, la cantidad administrada por lo general será una cantidad no tóxica eficaz para producir el resultado deseado.

40 Por ejemplo, un régimen de dosificación diaria típico para un paciente humano potencialmente en riesgo de sufrir presión arterial alta puede ser desde 0.0001 a 0.1 gramos, por ejemplo, en el intervalo de 0.001 a 0.05 gramos por kilogramo de peso corporal. Cuando se aísla y administra una fracción activa, la cantidad de material sólido administrado puede reducirse en una cantidad consistente con la pureza aumentada de la fracción. Por lo general, al menos 100 mg (peso seco o equivalente en peso seco), al menos 200 mg, y generalmente al menos 500 mg del extracto se administrarán por día a un paciente humano. En algunas realizaciones que comprenden la administración de las composiciones, las composiciones se administran en unidades de dosificación únicas o

múltiples por día, por ejemplo, de una a cuatro veces al día, o de una o dos veces al día. Además, las realizaciones proporcionan que los extractos de la invención se administran en forma sólida, líquida o semisólida. Por ejemplo, los extractos se administran según algunas realizaciones en forma de jugo de tomate o sus concentrados solos o en mezcla con otros jugos de frutas tales como el jugo de naranja.

- 5 Se puede administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un extracto de tomate, una fracción o un derivado del mismo, o una preparación farmacéutica del mismo, solo o en combinación con otro agente, a un sujeto con una afección asociada con la hipertensión. La administración causa una reducción en la presión arterial y puede causar una inhibición de la ACE. La administración puede causar la eliminación de uno o más síntomas de presión arterial alta o actividad de la ACE, la prevención de la mayor gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad y/o la reducción, prevención o eliminación de otras enfermedades o afecciones.

- 10 Los sujetos se pueden analizar para evaluar la presencia, la ausencia o el nivel de una enfermedad (por ejemplo, hipertensión o afección relacionada con la hipertensión y/o la actividad de la ACE), por ejemplo, analizando o midiendo un biomarcador, un metabolito, un síntoma físico, una indicación, etc., para determinar el riesgo o la presencia de hipertensión y/o un trastorno relacionado, y posteriormente el sujeto se puede tratar con una composición que comprende un extracto de tomate, una fracción activa del mismo o una formulación farmacéutica del mismo, solos o en combinación con otros agentes basados en el resultado de la prueba. Un paciente puede ser examinado, tratado y luego examinado nuevamente para controlar la respuesta al tratamiento. Los ciclos de prueba y tratamiento pueden ocurrir sin limitación del patrón de prueba y tratamiento (por ejemplo, prueba/tratamiento, prueba/tratamiento/prueba, prueba/tratamiento/prueba/tratamiento, prueba/tratamiento/prueba/tratamiento/prueba, prueba/tratamiento/tratamiento/prueba/tratamiento/tratamiento, etc.), la periodicidad o la duración del intervalo entre cada prueba y la fase de tratamiento.

- 15 Las composiciones que comprenden un extracto de tomate, una fracción activa del mismo, o una formulación farmacéutica del mismo, se pueden coadministrar con uno o más agentes terapéuticos adicionales o intervenciones médicas. La coadministración puede implicar la coformulación de dos o más agentes juntos en el mismo medicamento. Alternativamente, los agentes están en formulaciones separadas pero se administran juntos, ya sea simultáneamente o en secuencia (por ejemplo, separados por uno o más minutos, horas, días, etc.). En algunos casos, cuando se logra un beneficio sinérgico o aditivo, el agente coadministrado se puede proporcionar a una dosis más baja de la que se administraría normalmente si ese agente se utilizara de forma aislada para tratar la enfermedad o afección. Por ejemplo, uno o más de los siguientes agentes o intervenciones se pueden coadministrar o coaplicar con una composición que comprende un extracto de tomate, una fracción activa del mismo o una formulación farmacéutica del mismo: dieta baja en grasas, dieta baja en sal, ejercicio, un técnica de relajación (por ejemplo, meditación, biorretroalimentación), un inhibidor de la ACE, dejar de fumar, dieta rica en frutas, pérdida de peso, consumo reducido de alcohol, consumo reducido de cafeína, vitamina D y otros cambios en la dieta, como cambiar la dieta a una dieta rica en nueces, granos enteros, pescado, pollo, frutas y verduras.

- 25 Se puede administrar a un sujeto una dosis única de una composición que comprende un extracto de tomate, una fracción activa del mismo o una formulación farmacéutica del mismo. Alternativamente, se pueden administrar dosis múltiples en dos o más puntos de tiempo, separados por horas, días, semanas, etc. Las composiciones se pueden administrar durante un largo período de tiempo (por ejemplo, crónicamente), por ejemplo, durante un período de meses o años (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más meses o años). En tales realizaciones, las composiciones pueden tomarse de forma regular programada (por ejemplo, diariamente, semanalmente, etc.) durante la duración del período extendido.

Procedimientos de ejemplo para la preparación de un extracto de tomate.

Procedimiento de ejemplo 1

- 45 Se prepara un extracto de tomate para uso según la tecnología descrita, por ejemplo, usando una pasta de tomate de ruptura en frío disponible comercialmente de 28-30° Brix (por ejemplo, 28-30% de sólidos (p/p)) y con un índice de pardeamiento inferior a 0.350 AU (donde el índice de pardeamiento se define como la absorbancia a 420 nm de una solución que tiene 12.5 g de sólidos solubles por litro) como material de partida. La pasta se diluye, por ejemplo, aproximadamente 1 a 5, con agua ultrapura y el material de partículas grandes se elimina por filtración centrífuga, seguido de una clarificación usando un Separador Westfalia MSB-14 (un clarificador de disco centrífugo) a temperatura ambiente. El material de partículas más pequeñas se elimina luego por microfiltración a una temperatura que no excede los 45 °C para dar una solución clara de color pajizo que no contiene sólidos insolubles (capaces de ser centrifugados) y que puede pasar a través de un filtro de 0.2 µm sin pérdida de sólidos solubles. Esta solución se concentra por evaporación para formar un jarabe de 62-65° Brix usando condiciones cuidadosamente controladas y una temperatura que no supera los 80 °C para inhibir las reacciones de pardeamiento no enzimático. Una etapa de pasteurización instantánea (por ejemplo, a 105 °C durante 3 segundos) se incorpora al inicio del procedimiento de evaporación. El producto final se caracteriza por lo general por un índice de pardeamiento inferior a 0.600 AU y un recuento total de placa microbiana inferior a 1000. El extracto concentrado se añade en algunas realizaciones a una matriz de jugo de naranja para la administración, por ejemplo, a pacientes.

Procedimiento de ejemplo 2

Una preparación alternativa de extracto de tomate y subfracciones del mismo se prepara a partir de tomates para producir un extracto acuoso. Según este procedimiento de ejemplo, se prepara un extracto acuoso de fruta de tomate madura mediante homogeneización de tomates frescos (*Lycopersicon esculentum*, de origen local), centrifugación y clarificación del líquido de color pajizo resultante mediante ultrafiltración (membrana de ultrafiltración, corte MW de 1000 Da, Millipore (UK) Ltd., Watford, UK). Un análisis típico demuestra que el extracto acuoso de tomate consiste en gran parte en azúcares solubles (85-90% de materia seca). Estos constituyentes se eliminan usando extracción en fase sólida con cartuchos de estireno divinilbenceno (SDVB) (JT Baker, Mallinckrodt Baker BV, Deventer, Holanda) a pH 2.5. Los componentes que no contienen azúcar se retienen en los cartuchos y se eluyen en metanol. Por lo general, el material libre de azúcar representa aproximadamente el 4% de la materia seca del extracto acuoso. En algunas realizaciones, la HPLC semipreparativa se usa para subfraccionar componentes del material libre de azúcar en tres grupos amplios. Por ejemplo, HPLC que utiliza columnas Synergy Polar-RP, 4 µm, 250 x 10 mm y Luna C18 (2), 3 µm, 250 x 10 mm (Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido) y gradientes de acetonitrilo/TFA al 0.05% proporciona un método para esta etapa. Las fracciones de HPLC, en algunas realizaciones, se reconstituyen a concentraciones conocidas en solución salina regulada con fosfato (PBS, Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) y se ajustan opcionalmente a pH 7.4 antes del uso, por ejemplo, para experimentos in vitro.

Ejemplos

Preparación del extracto de tomate.

Durante el desarrollo de realizaciones de la tecnología descrita en este documento, se prepararon y ensayaron extractos de tomate. En algunas realizaciones, los tomates se homogeneizaron con un mezclador Brown Turbo durante 20-30 segundos a la velocidad más alta. El homogeneizado se centrifugó luego a 9000 x g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se hirvió luego durante 30 minutos y se centrifugó de nuevo. El sobrenadante se eliminó y se liofilizó durante la noche. El material seco se disolvió en agua de doble destilación y el pH se ajustó a 7.4. Las muestras se sometieron a ultrafiltración usando un dispositivo centrífugo Microsep™ (Pall Corporation, EE. UU.) con un corte de peso molecular de 1000 kDa. El ultrafiltrado se recogió, se liofilizó y se reconstituyó en agua; El pH se ajustó a 7.4 para estudios adicionales.

Eliminación de los azúcares solubles en agua del extracto.

En algunas realizaciones de las composiciones de extracto de tomate, un extracto de tomate contenía más de 50% de azúcares solubles en agua inactivos. De acuerdo con lo anterior, estos azúcares se eliminaron del extracto. La cromatografía en columna de extracción en fase sólida se usó para eliminar los azúcares, por ejemplo, usando un cartucho Bond Elut ENV (Agilent). Los cartuchos Bond Elut ENV se acondicionaron con 2 x 4 ml de metanol al 100% y luego se equilibraron con 2 x 4 ml de agua destilada. Se cargó un volumen de 4 ml de la muestra preparada (que comprende aproximadamente 1 g del extracto de tomate) en el cartucho. Los cartuchos se lavaron con 2 x 3 ml de agua de doble destilación, y luego el componente soluble en agua se eluyó del cartucho usando agua. Los cartuchos se secaron completamente antes de eluir los componentes libres de azúcar. Después del secado, los componentes libres de azúcar se eluyeron con 3 x 2 ml de metanol al 100% usando una velocidad de flujo lenta (por ejemplo, gota a gota) y los eluatos se recogieron en tubos. Las muestras eluidas se evaporaron a sequedad bajo N₂ a 45 °C y luego se disolvieron en 500 µl de agua milliQ. Tanto el eluato de agua como el eluato de metanol se probaron luego para determinar sus actividades inhibitorias contra la ACE. El material liofilizado de cada una de estas etapas se usó para probar la presencia de actividades antiplaquetarias.

Ensayo de enzima convertidora de angiotensina (ACE)

La enzima convertidora de angiotensina I (ACE, EC 3.4.15.1) es una enzima circulante que participa en el sistema renina-angiotensina del cuerpo que regula la presión arterial. Durante el desarrollo de realizaciones de la tecnología proporcionada en este documento, se realizaron experimentos para probar el efecto del extracto de tomate en la actividad de la ACE en suero. La actividad de la ACE se midió usando el kit de ensayo de enzima convertidora de angiotensina.

Aislamiento de componentes antihipertensivos a partir de tomates.

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en este documento, los extractos de tomate se caracterizaron y probaron su actividad frente a la ACE. Estos resultados se resumen en las tablas 1, 2 y 3, que recopilan datos relacionados con el aislamiento de las realizaciones del extracto de tomate libre de azúcar que se proporciona en este documento y el efecto inhibitorio de tanto el jugo de tomate y extracto de tomate libre de azúcar de una manera dependiente de la dosis. Después de la preparación y la prueba, se descubrió que los componentes activos del extracto son solubles en agua, estables al calor y tienen una masa molecular inferior a 1000 Da. Además, el material seco contenía una alta cantidad de azúcares solubles (aproximadamente 50%). Los azúcares inactivos se eliminaron mediante cromatografía en fase sólida, por ejemplo, mediante cromatografía en columna de extracción en fase sólida usando un cartucho Bond Elut ENV. El rendimiento de los factores antihipertensivos libres de azúcar fue de 67.86 mg por 100 g de tomates.

Tabla 1: Preparación de extracto de tomate.

| | |
|--|----------|
| Peso inicial de tomates | 207.89 g |
| Peso seco del sobrenadante de extracto hervido | 6.14 g |
| Peso seco después de eliminar los azúcares por cromatografía en columna de fase sólida | 151 mg |
| Cantidad total de materiales activos libres de azúcar por 100 g de tomates | 72.63 mg |

Tabla 2: Inhibición de la actividad de la ACE en suero humano mediante el jugo de tomate fresco (el jugo se preparó después de la centrifugación a 9000xg a 4C durante 15 minutos de jugo de tomate)

| | Volumen de jugo | Inhibición de la actividad de la ACE (%) |
|----------------|-----------------|--|
| Jugo de tomate | 0 | 0 |
| Jugo de tomate | 10 µL | 30 |
| Jugo de tomate | 20 µL | 35 |
| Jugo de tomate | 30 µL | 40 |

5

Tabla 3: Inhibición de la actividad de la ACE en suero humano por el extracto de tomate libre de azúcar de una manera dependiente de la dosis

| | Concentración final | Inhibición de la actividad de la ACE (%) |
|------------------------------------|---------------------|--|
| Extracto de tomate libre de azúcar | 0 | 0 |
| | 0.48 mg/ml de suero | 18 |
| | 0.95 mg/ml de suero | 30 |
| | 1.90 mg/ml de suero | 48 |
| | 2.86 mg/ml de suero | 60 |
| | 3.80 mg/ml de suero | 70 |
| | 5.72 mg/ml de suero | 85 |

10 La enzima convertidora de angiotensina I (ACE, EC 3.4.15.1) es una enzima circulante que participa en el sistema de renina-angiotensina del cuerpo que regula la presión arterial. El efecto del jugo de tomate y el extracto de tomate libre de azúcar sobre la actividad de la ACE en suero se midió usando el kit REA Direct del ensayo de enzima convertidora de angiotensina (ensayo enzimático radioeléctrico) (Buhlmann, Alemania). Por lo general, el suero (50 µL) se incubó con diferentes cantidades de extracto libre de azúcar o volúmenes de jugo de kiwi durante 15 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se midió la actividad de la ACE del suero con el kit ACE.

15 Tabla 4: Actividad inhibidora de la agregación plaquetaria del extracto de tomate sin azúcar

| | Cantidad añadida en 0.225 ml de PRP | Inhibición de la agregación plaquetaria (%) |
|------------------------------------|-------------------------------------|---|
| Extracto de tomate libre de azúcar | 0 | 0 |
| | 20 µL | 30 |
| | 80 µL | 60 |
| | 200 µL | 90 |

- 5 La actividad antiplaquetaria del extracto de tomate libre de azúcar se midió en plasma rico en plaquetas (PRP). El pH de todas las muestras se ajustó a 7.4 antes de probar su efecto sobre la agregación plaquetaria. La sangre venosa se recolectó de voluntarios que no habían tomado ningún medicamento durante al menos 14 días antes de la donación. Se recogió sangre (20-30 ml) usando una aguja de mariposa 19G y se evitó la coagulación mezclando las muestras de sangre con citrato de ácido (135 mM) en una proporción de 9 partes por volumen de sangre hasta 1 parte por volumen de citrato de ácido. Se preparó PRP a partir de las muestras mediante centrifugación de la sangre a 180 xg durante 15 min. a temperatura ambiente. Las cantidades de extracto de tomate como se indica en la tabla se incubaron con 0.225 ml de PRP a 37 °C, durante 15 min. después de lo cual se controló el efecto del extracto de tomate sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP con la adición de ADP a una concentración final de 3 μ M.
- 10 Los controles se analizaron en paralelo usando una solución reguladora de fosfato, pH 7.4 en lugar de. La agregación plaquetaria en PRP se controló usando Aggram, Helena, EE. UU., a una velocidad de agitación constante de 1000 rpm a 37 °C.
- 15 La figura 1 también proporciona un gráfico que representa el efecto del extracto de tomate libre de azúcar en la inhibición de la actividad de la proteína ACE pura. La actividad de la ACE se midió mediante un ensayo de radioactividad como se describe. Se usó la enzima ACE del pulmón de conejo (producto Sigma No. A6778) EC 3.4.15.1 número CAS 9015-821-1. Se incubaron cantidades crecientes de proteína ACE en ausencia y presencia de 30 μ L de extracto de tomate libre de azúcar (Fruitflow) durante 30 minutos a 37 °C y luego se midió la actividad residual de la ACE. El extracto de tomate inhibe casi completamente la actividad de la ACE en comparación con la actividad de la ACE de control no tratada.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un extracto de tomate para uso como un medicamento para tratar la hipertensión en la que la composición se produce mediante un procedimiento que comprende las etapas de:
 - a) homogeneización de los tomates;
- 5 b) eliminación de partículas por centrifugación y/o ultrafiltración; y
- c) eliminación de los azúcares solubles.
2. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que la composición es un extracto de tomate libre de azúcar, soluble en agua.
- 10 3. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el extracto de tomate se hace a partir de una pasta de tomate de ruptura en frío.
4. La composición para uso según la reivindicación 1 producida por un procedimiento que comprende las etapas de:
 - a) dilución en agua de una pasta de tomate de 28-30° Brix y un índice de pardeamiento inferior a 0.350 AU;
 - b) eliminación de materia particulada mayor de 0.2 µm para producir una solución; y
 - c) concentración de la solución para formar un jarabe de 62-65° Brix.
- 15 5. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el procedimiento comprende además fraccionar los componentes que no son azúcares usando cromatografía líquida de alta presión.
6. La composición para el uso según la reivindicación 1, que comprende un extracto de tomate, que se puede obtener mediante un método que comprende las etapas de:
 - a) homogeneización de un tomate para producir un homogeneizado de tomate;
- 20 b) filtración del homogeneizado de tomate a través de un filtro que tiene un corte de peso molecular de 1000 Da para producir un filtrado;
- c) recolección del filtrado para proporcionar un extracto; y
- d) eliminación de un azúcar soluble en agua del extracto.
- 25 7. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que el tomate se pela antes de la etapa de homogeneización.
8. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el extracto de tomate está en forma de un concentrado o un deshidratado.
9. La composición para su uso según la reivindicación 8, en la que el extracto de tomate está en forma de un concentrado que está al menos 2 veces concentrado.
- 30 10. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el extracto de tomate se ha deshidratado para dar un extracto seco.
11. La composición para su uso según la reivindicación 10, en la que el extracto seco está en forma de una forma de dosificación sólida o semisólida.
- 35 12. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que el extracto está contenido dentro de una cubierta de cápsula.
13. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que el extracto contiene un compuesto soluble en agua sustancialmente estable al calor o compuestos que tienen un peso molecular inferior a 1000.
- 40 14. La composición para uso como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que el extracto está en forma de una fracción activa de la fruta de tomate capaz de pasar a través de un filtro de ultrafiltración que tiene un corte de peso molecular de 1000 y que contiene un compuesto o compuestos solubles en agua sustancialmente estables al calor, incoloros o de color pajizo, que tienen un peso molecular inferior a 1000.

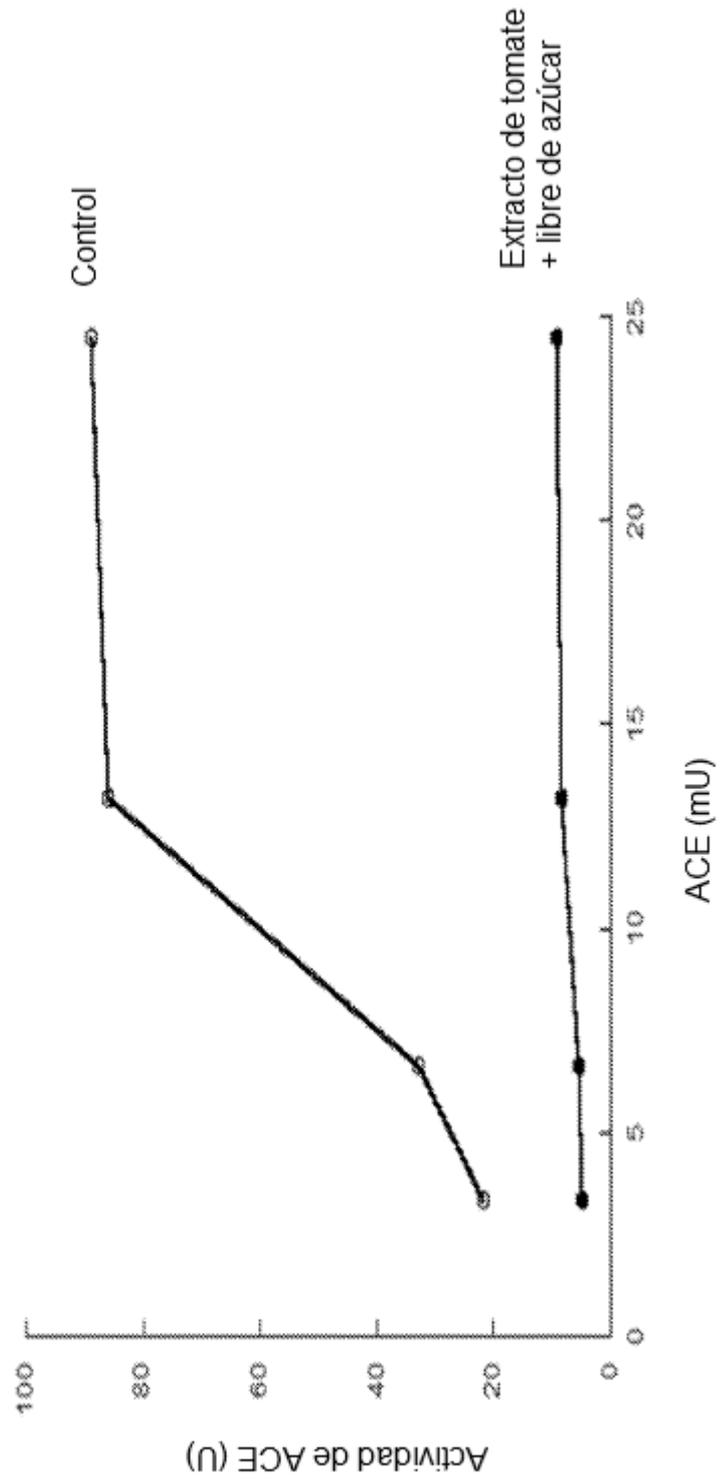


Figura 1