

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 486**

51 Int. Cl.:

A61K 36/81 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/01 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2015 PCT/IL2015/051129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016 WO16084068**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2015 E 15820643 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3220934**

54 Título: **Composición de tomate biológicamente activa que tiene una cantidad reducida de licopeno**

30 Prioridad:

25.11.2014 US 201462083909 P

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

14.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZELKHA, MORRIS;
SEDLOV, TANYA;
SHARONI, YOAV y
LEVY, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 742 486 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

Composición de tomate biológicamente activa que tiene una cantidad reducida de licopeno

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo del procesado de alimentos. Particularmente, la invención se refiere a una composición de tomate biológicamente activa que tiene una cantidad reducida de licopeno.

10 Antecedentes de la invención

Los productos de tomate se usaron mucho en tanto la industria alimentaria como, cada vez más, en la preparación de composiciones nutracéuticas y cosmeceúticas.

15 El documento US 2012/258182 describe composiciones farmacéuticas para la administración oral que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación sinérgica de licopeno y al menos un fitoesterol en donde la relación de dicho licopeno y dicho fitoesterol en dicha composición farmacéutica es un máximo de aproximadamente 5:1 y en donde dicha composición produce una inhibición sinérgica de crecimiento celular.

20 El documento US 5.837.311 describe un proceso industrial para la preparación de productos derivados de tomate incluyendo entre otros una oleorresina de tomate que contiene altos niveles del carotenoide licopeno. Este producto de oleorresina también contiene un intervalo extraordinariamente grande de componentes farmacológicamente activos adicionales incluyendo otros carotenoides tales como fitoeno, fitoflueno y beta-caroteno, así como tocoferoles y fitoesteroles. Este producto de oleorresina se ha vendido y usado ampliamente y con éxito durante ya
25 muchos años, y el rango de enfermedades que se pueden prevenir y/o tratar con él incluye, pero sin limitación, afecciones cancerosas (particularmente cáncer de próstata), presión sanguínea elevada, aterosclerosis, afecciones de la piel y daño celular y de ADN.

30 Aunque se ha probado que esta preparación de oleorresina de tomate es altamente efectiva en el tratamiento de la salud y la prevención de enfermedad, su notable color rojo puede, en algunas circunstancias, ser ventajoso, por ejemplo, cuando se contempla su uso sobre la piel como agente cosmético o cosmeceútico.

35 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una solución a este problema proporcionando un producto derivado del tomate que tiene un intervalo similar (o mejorado) de la actividad terapéutica a la oleorresina de tomate anteriormente mencionada que se conoce comercialmente como Lyc-O-Mato®, pero la cual tiene un color rojo mucho menos marcado, debido a su bajo contenido de licopeno.

Otras reivindicaciones y objetivos de la invención se verán con claridad cuando se desarrolle la descripción.

40 Compendio de la invención

La presente invención está dirigida principalmente a una composición derivada de tomate con licopeno reducido, que comprende licopeno y uno o ambos de fitoeno y fitoflueno, y fitoesteroles, en donde la concentración de dicho
45 licopeno está en el intervalo de 0,3 % a 2 % (peso/peso), en donde la relación en peso de dicho licopeno y uno o ambos de fitoeno y fitoflueno está en el intervalo de 1:1 a 1:2,5 y en donde la concentración de fitoesteroles es de al menos 2 % (peso/peso).

50 En una realización preferida la composición anteriormente descrita comprende además vitamina E a una concentración de al menos 2 % (peso/peso).

En una realización preferida de la invención, la concentración de uno o ambos de fitoeno y fitoflueno a una concentración total de entre 0,25 % y 3 %.

55 En el contexto de la presente descripción, los términos composición "con licopeno reducido" y "de bajo licopeno", y similares, se usan intercambiamente, y se entiende que todos dichos términos se refieren a la composición que tiene la composición de carotenoide definida en el párrafo previo.

60 Hay que indicar que la composición de la presente invención posee actividad biológica significativa (incluyendo, pero sin limitación, actividad antiinflamatoria, a pesar del hecho de que el contenido de licopeno de dicha composición se reduce al menos tres veces cuando se compara con un producto de oleorresina de tomate comúnmente usado de la técnica anterior (Lyc-O-Mato®). Este resultado es completamente inesperado, puesto que muchos de los efectos terapéuticos de las oleorresinas de tomate resultantes se han atribuido a su contenido de licopeno.

65 En una realización preferida, la composición de la presente invención tiene una concentración de disolvente de menos de 50 ppm.

5 En algunas realizaciones, la composición de la presente invención también puede comprender uno o más componentes farmacológicamente activos adicionales que incluyen, pero sin limitación, carotenoides adicionales, vitamina E y polifenoles, tales como el ácido carnósico. Ejemplos preferidos de carotenoides adicionales incluyen fitoeno, fitoflueno, luteína, zeaxantina, beta-caroteno, astaxantina. Otros carotenoides, sin embargo, también pueden estar presentes en la composición, o bien además de, o en lugar de, los ejemplos anteriormente enumerados.

En una realización preferida de la invención, la composición con licopeno reducido además comprende ácido carnósico.

10 En otra realización preferida, la composición con licopeno reducido comprende además sólidos de tomate solubles.

En una realización preferida adicional la composición de la presente invención comprende además beta-caroteno y vitamina E. Preferentemente, los componentes adicionales anteriormente mencionados están presentes en los siguientes intervalos de concentración: 0,2 %-1,0 % de beta-caroteno; 2,0 %-4 % de Vitamina E.

15 En una realización preferida, la composición anteriormente descrita se prepara a partir de tomates.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un proceso para preparar la composición derivada de tomate, de bajo contenido de licopeno anteriormente definida, en donde dicho proceso comprende las etapas de:

20 1. Proporcionar un producto de tomate que comprende 5 %-20 % de Licopeno (por ejemplo, tal como se describe en el documento US 5.837.311).

25 2. Añadir un disolvente o mezcla de disolvente que disuelve los lípidos y no el licopeno, incluyendo (pero sin limitación) etanol, alcohol isopropílico (IPA) o acetona a una relación mayor de 1:1 (disolvente:producto de tomate), preferentemente a una relación de 3:1.

3. Calentar la mezcla de disolvente/extracto de tomate a una temperatura de aproximadamente 25-60 °C.

30 4. Separar el material cristalino del disolvente por medio de separación por filtración y/o centrifuga.

5. Opcionalmente incorporar los cristales, los cuales contienen aproximadamente 70 % de licopeno, en formulaciones colorantes.

35 6. Evaporar el disolvente (el cual, en el caso de etanol, preferentemente deja un licor que tiene menos de 50 ppm de etanol), el cual, a continuación, se puede reciclar para su uso en la etapa 2.

40 7. Estandarizar el licor resultante a la concentración requerida, por ejemplo, añadiendo la composición de suministro.

En una realización preferida del proceso anteriormente descrito, el disolvente usado en la etapa 2 es etanol.

En una realización preferida del proceso anteriormente descrito, la relación de disolvente:producto de tomate es de 4:1.

45 Aunque se puede usar cualquier producto que contiene carotenoide derivado del tomate adecuado como material de partida para este proceso, en una realización altamente preferida, el producto de tomate usado como material de partida es oleoresina. En otra realización preferida, el producto de tomate usado como material de partida comprende pieles de tomate.

50 Inesperadamente se ha encontrado que la composición descrita en el presente documento, a pesar de su concentración de licopeno altamente reducida (en relación con las oleoresinas de tomate de la técnica anterior) causa producción incrementada de óxido nítrico (NO) en tejidos vasculares. Además, se ha encontrado que la presente composición causa inducción significativa de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial en el endotelio vascular.

También se ha encontrado inesperadamente que la composición descrita en la presente causa un incremento significativo en la actividad del sistema del elemento de respuesta antioxidante (ARE).

60 Además se ha encontrado inesperadamente que la composición descrita en la presente causa inhibición significativa del sistema de transcripción de NFκB proinflamatorio.

65 La composición anteriormente descrita se puede usar como un medicamento para tratar muchos tipos diferentes de enfermedades. En una realización preferida, dicho medicamento es adecuado para su uso en el tratamiento de trastornos del sistema cardiovascular, incluyendo pero sin limitación la presión sanguínea elevada.

En otra realización preferida, el medicamento se puede usar para tratar o prevenir daño vascular y/o neuropatía en sujetos diabéticos.

5 En otra realización preferida más, la afección a tratar se caracteriza por tener un componente inflamatorio. En una realización particularmente preferida, el medicamento se usa para tratar y/o prevenir la inflamación vascular.

En una realización aún más preferida, el medicamento de la presente invención se puede usar para prevenir la aparición de las afecciones neoplásicas.

10 En algunas realizaciones, dicha composición comprende además uno o más de los componentes activos adicionales anteriormente mencionados en el presente documento, tal como carotenoides adicionales, polifenoles (tales como ácido carnósico), vitamina E, fitoesteroles y sólidos de tomate adecuados (por ejemplo, en forma de un concentrado de tomate claro (CTC) preparado concentrando el suero obtenido a partir de tomates después de la separación de pulpa-suero).

15 En un aspecto adicional, la presente invención está dirigida al uso de la composición derivada de tomate con licopeno reducido anteriormente definida como medicamento tópico. En una realización preferida de este aspecto, el medicamento tópico es una preparación cosmética o cosmeceútica, y se puede preparar en forma de una crema, loción, pomada, gel y demás.

20 En una realización preferida, dicho agente cosmético o cosmeceútico se usa como protector solar, en donde la composición cosmeceútica también comprende además agentes de protección solar convencionales, incluyendo pero sin limitación, PABA, óxido de zinc, óxido de titanio, cinoxato, Padimato O y ácido sulfónico de fenilbencimidazol.

25 En otra realización preferida, la composición derivada de tomate de la presente invención se usa como agente antienvjecimiento. En algunas realizaciones de la invención, la composición de tomate anteriormente definida se usa como el único agente activo, en otros casos, el agente cosmético o cosmeceútico comprende un componente activo adicional.

30 En otra realización preferida, la presente invención está dirigida al uso de la composición derivada de tomate con licopeno reducido anteriormente definida como un medicamento administrado sistémicamente, incluyendo, pero sin limitación, medicamentos para la administración oral y medicamentos adecuados para la administración parenteral. Además, la composición de la presente invención se puede usar como un medicamento adecuado para la administración tópica.

Breve descripción de los dibujos

40 La **Figura 1** ilustra esquemáticamente un proceso para preparar una composición de tomate de bajo contenido de licopeno.

La **Figura 2** ilustra gráficamente el incremento en niveles de NO en células endoteliales vasculares, siguiendo el tratamiento con la composición de bajo licopeno de la presente invención.

45 La **Figura 3** ilustra gráficamente el incremento en la inducción de peNOS en células endoteliales vasculares, seguido de tratamiento con la composición de bajo licopeno de la presente invención.

La **Figura 4** representa gráficamente el incremento en la actividad de ARE en las células de cáncer de próstata LNCaP causado por la composición de bajo licopeno de la presente invención.

50 La **Figura 5** representa gráficamente el incremento en la actividad de ARE en las células de cáncer de mama T47D causado por la composición de bajo licopeno de la presente invención.

55 La **Figura 6** representa gráficamente la inhibición del sistema de transcripción de NFκB en células ce cáncer de mama T47D que está causado por la composición de bajo licopeno de la presente invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

60 Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, la presente invención proporciona composición que comprende un producto de tomate con licopeno reducido, en donde un esquema general del proceso para fabricar dicha composición se resume en la Figura 1 y comprende las etapas de:

Etapas **1:** Proporcionar un producto de tomate que comprende 5 %-20 % de Licopeno (por ejemplo, una oleoresina, como se describe en el documento US 5.837.311, o pieles de tomate).

65 Etapas **2:** Añadir un disolvente o mezcla de disolvente que disuelve los lípidos y no el licopeno tal como etanol o isopropanol o acetona a una relación mayor de 1:1 (disolvente:producto de tomate), preferentemente a una

relación de 3:1 o 4:1.

Etapa 3: Calentar la mezcla de disolvente/extracto de tomate a una temperatura de aproximadamente 25-60 °C.

Etapa 4: Separar el material cristalino del disolvente por medio de separación por filtración o centrifuga.

5 Etapa 5: Incorporar opcionalmente los cristales, los cuales contienen aproximadamente 70 % de licopeno, en formulaciones colorantes.

Etapa 6: Evaporar parcialmente el disolvente (preferentemente dejando un licor que tiene menos de 50 ppm de disolvente), el cual, a continuación, se puede reciclar para su uso en la etapa 2.

Etapa 7: Estandarizar el licor resultante a la concentración requerida, añadiendo la composición de suministro.

10 Composiciones farmacéuticas

Aunque los agentes activos, licopeno y fitoeno/fitoflueno, opcionalmente en combinaciones con otros carotenoides, y/o agentes adicionales, se pueden administrar solos, se contempla que estos compuestos se administrarán en una composición farmacéutica que contiene los principios activos juntos con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y ayudantes, los cuales facilitan el procesamiento de los compuestos activos dentro de las preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Los agentes activos se formulan como composiciones farmacéuticas y se administran a un sujeto mamífero, tal como un paciente humano en diversas formas tales como líquido, sólido y semisólido. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un sujeto por cualquier método conocido para un experto en la técnica, tal como oralmente, tópicamente, parenteralmente, transmucosamente, transdérmica, intramuscularmente, intravenosamente, intradérmicamente, subcutáneamente, intraperitonealmente, intraventricularmente, intracranealmente o intratumoralmente. Para la administración oral, los compuestos se pueden formular combinando los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica. Las composiciones se pueden formular en cualquier forma farmacéutica sólida o líquida conocida en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, comprimido, comprimido oblongo, cápsula, microcápsula, pelet, píldora, polvo, jarabe, gel, suspensión acuosa (*slurry*), gránulo, suspensión, dispersión, emulsión, líquido, solución, gragea, perla y pequeñas perlas (*beadlet*). Las composiciones orales se pueden formular como formulaciones de liberación inmediata, o como formulaciones de liberación controlada o sostenida que permiten la liberación prolongada del(de los) principio(s) activo(s) durante un periodo de tiempo predeterminado.

Los excipientes adecuados para las formulaciones sólidas incluyen, pero sin limitación, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; excipientes basados en almidón tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata y similares, gelatina, tragacanto de goma, excipientes basados en celulosa como celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxipropilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y similares. También se pueden usar polímeros tales como polivinilpirrolidona (PVP) y PVP reticulado. Además, las composiciones pueden comprender además aglutinantes (por ejemplo, acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona), agentes desintegrantes (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma guar, glicolato sódico de almidón), tensioactivos (por ejemplo, lauril sulfato de sodio), y lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, lauril sulfato de sodio).

Para formulaciones líquidas, los portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones, emulsiones o aceites acuosos o no acuosos. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, y ésteres orgánicos inyectables. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Ejemplos de aceites incluyen, pero sin limitación, de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de girasol, y aceite de hígado de pescado.

Las composiciones farmacéuticas orales preferidas incluyen cápsulas hechas de gelatina así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificador, tal como glicerol o sorbitol. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores. En ciertas realizaciones preferidas las cápsulas excluyen componentes de origen animal y son aceptables para vegetarianos y veganos.

Las cápsulas de gelatina blandas y los métodos para prepararlos son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes se pueden encontrar en la patente americana 6.217.902; 6.258.380; 5.916.591 y 4.891.229. Otros excipientes y aditivos aceptables conocidos por el experto en la técnica se pueden incluir en las composiciones de la presente invención, por ejemplo, estabilizadores, solubilizadores, agentes aumentadores de tonicidad, sustancias tampón, conservantes, espesantes, agentes de complejación y otros excipientes, así como agentes terapéuticos adicionales.

Un solubilizador puede ser, por ejemplo, tiloxapol, polietilenglicol ésteres de glicerol ácido graso, polietilenglicol

ésteres de ácido graso, polietilenglicoles, éteres de glicerol o mezclas de aquellos compuestos. Un ejemplo específico de un solubilizador es un aceite de ricino polioxietilado, por ejemplo, los productos comerciales Cremophor® o Cremophor® RH40. Otro ejemplo de un solubilizador es tiloxapol. La concentración usada depende especialmente de la concentración del principio activo. La cantidad añadida normalmente es suficiente para solubilizar el principio activo. Por ejemplo, la concentración del solubilizador es de 0,1 a 5.000 veces la concentración del principio activo.

Ejemplos de sustancias tampón son acetato, ascorbato, borato, hidrógeno carbonato/carbonato, citrato, gluconato, lactato, fosfato, propionato y tampones TRIS (trometamina). La cantidad de sustancia tampón añadida es, por ejemplo, la necesaria para asegurar y mantener un intervalo de pH fisiológicamente tolerable. El intervalo de pH normalmente está en el intervalo de desde 5 a 9, preferentemente desde 5,2 a 8,5.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender además excipientes no tóxicos, tales como, por ejemplo, emulsionantes, agente humectantes o cargas, tales como, por ejemplo, los polietilenglicoles (PEG200, 300, 400 y 600) o Carbowax® (Carbowax1000, 1500, 4000, 6000 y 10000). Otros excipientes que se pueden usar si se desea están enumerados a continuación pero no se pretende que limiten de ninguna manera el alcance de los posibles excipientes. Pueden ser agentes de complejación, tales como disodio-EDTA o antioxidantes EDTA 5, tales como ácido ascórbico, acetilcisteína, cisteína, hidrógeno sulfito de sodio, butil-hidroxianisol, butil-hidroxitolueno; estabilizadores, tales como tiourea, tiosorbitol, dioctil sulfosuccinato de sodio o monotioglicerol; u otros excipientes, tales como, por ejemplo, éster de sorbitol ácido láurico, metanol amina oleato o éster de ácido palmítico.

La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, de muchos factores incluyendo el sujeto a tratar, la gravedad de la afección, la manera de administración, y la opinión del médico. Sin embargo, la dosis empleada generalmente dependerá de un número de factores, incluyendo la edad y el sexo del paciente, y la gravedad de la enfermedad a tratar.

Preferentemente, las preparaciones están en forma farmacéutica única, prevista para la administración oral. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis únicas que contienen cantidades apropiadas de los componentes activos. La forma farmacéutica única puede ser una preparación empaquetada, conteniendo el paquete cantidades discretas de la preparación, por ejemplo, comprimidos, cápsulas y polvos en viales o ampollas. La forma farmacéutica única también puede ser una cápsula, oblea, o comprimido por sí misma o puede ser el número apropiado de cualquiera de estos en forma empaquetada.

La pauta posológica de las composiciones de la presente invención puede variar según la solicitud particular y la potencia de los principios activos. La determinación de la dosis apropiada está dentro de la experiencia de la técnica. Por conveniencia, se prefiere una dosis diaria única. Como alternativa, la dosis diaria total se puede dividir y administrar en partes durante el día tal como dos veces al día, tres veces al día y similares. También se contempla administración bisemanalmente, semanalmente, bimensualmente y mensualmente.

La presente invención además se describirá en los siguientes Ejemplos, los cuales se traen con fines ilustrativos solamente, y no limitan de ninguna manera el alcance de la invención.

Ejemplo preparativo 1

Proceso para producir la composición derivada de tomate con baja concentración de licopeno de la presente invención

La composición con baja concentración de licopeno de la presente invención se preparó de acuerdo con las siguientes etapas del proceso:

1. Se preparó una oleoresina de tomate que tenía la siguiente composición según el proceso descrito en el documento US 5.837.311:

- 10,1 % de licopeno
- 1,7 % de fitoeno y fitoflueno
- 2,5 % de fitoesteroles
- 2,5 % de vitamina E
- 82,7 % de ácidos grasos libres
- 0,5 % de agua

(Hay que indicar que esta preparación se puede comprar bajo el nombre comercial de Lyc-O-Mato®, fabricado

por LycoRed Ltd. de Be'er Sheva, Israel.)

2. Se añadió 100 ml de la oleoresina de tomate preparada según la etapa 1 a un vaso de mezcla que contenía 300 ml de etanol al 98 %, y se mezcló a 40 °C durante 0,5 horas.

3. Se usó un filtro prensa para separar el material cristalino del disolvente de etanol. Esta separación produjo 10,94 g de material cristalino que comprendía 85 % de licopeno y 15 % de ácidos grasos.

4. A continuación, el filtrado de la etapa 3 se sometió a evaporación, para separar la mayoría del etanol, dejando 89 g de un licor (el cual es el producto de bajo licopeno de la presente invención) que tenía la siguiente composición:

2,0 % de licopeno

2,2 % de fitoeno y fitoflueno

2,8 % de fitoesteroles

2,8 % de vitamina E

Ejemplos experimentales

Métodos generales

Cultivo celular y tratamientos

Se aislaron células endoteliales de la vena umbilical humana primaria (HUVEC) de los cordones umbilicales. Se recogieron las células mediante tratamiento con colagenasa al 0,1 % (Worthington, Lakewood, NJ, USA). Se cultivaron HUVEC en matraces de cultivo de tejido revestidos previamente con gelatina al 0,2 % (Corning, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) en medio M-199 con 20 % de BCS y otros complementos como se describen para EA.hy926. Se usaron células EA.hy926 hasta el paso 37, HUVEC en el paso 3-8. Se cultivaron monocitos U937 en medio RPMI 1640 con 10 % de BCS, L-glutamina y antibióticos como se ha especificado antes. Para la mayoría de los experimentos las células endoteliales en 70-90 % de confluencia se privaron de comida en medio DMEM con 5 % de BCS/M199 durante 24 horas y se incubaron previamente con vehículo o solución de carotenoides en DMEM con 5 % de BCS/M199 durante 18 a 24 horas, y se activaron con 10 ng/ml de TNF- α (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) para tiempos especificados.

Soluciones carotenoides

Las soluciones madre (400 μ M) de oleoresina (Lycored Natural Products Ltd., Beer-Sheva, Israel), que contenían o bien 6 % o 7 % de licopeno, 0,1 % de β -caroteno, 1 % de vitamina E y polifenoles, y la composición de bajo licopeno de la presente invención (como se obtiene según el Ejemplo preparativo 1, anterior) se prepararon en tetrahidrofurano (THF) fresco que contenía 0,025 % de hidrotolueno butilado (BHT) (ambos de Sigma, St. Louis, MO, USA) como antioxidante, y se añadieron al medio de cultivo bajo corriente de N₂ e iluminación reducida.

Ejemplo experimental 1

El efecto de la composición derivada de tomate con baja concentración de licopeno de la presente invención sobre la expresión de óxido nítrico (NO)

NO es una molécula de señalización clave en muchos procesos biológicos y tejidos. En el caso de los tejidos vasculares, el endotelio usa óxido nítrico para señalar el músculo liso circundante para relajar, así dando como resultado vasodilatación y flujo sanguíneo incrementado. El NO juega además un papel en la función vascular inhibiendo el crecimiento del músculo liso vascular, la agregación de plaquetas, y la adhesión de leucocito al endotelio. En muchos casos de enfermedad humana que se caracterizan por la presencia de lesiones cardiovasculares (tales como aterosclerosis, diabetes, o hipertensión), se puede encontrar con frecuencia función de la ruta de NO alterada.

En el presente estudio, se usó un modelo celular endotelial coronario humano cultivado para evaluar el efecto de la composición con baja concentración de licopeno (2 %) de la presente invención sobre la inducción de NO. Esto se consiguió tanto por la medida directa de la producción de NO por las células cultivadas, como por ensayo de la actividad de la enzima NO sintasa de célula endotelial, peNOS. Los resultados conseguidos con la composición de la presente invención se compararon con los resultados obtenidos con el uso de una composición derivada de tomate con alto licopeno, Lyc-O-Mato 7 % (fabricado y suministrado por LycoRed Ltd., Be'er Sheva, Israel).

Métodos y materiales:

La composición de bajo licopeno (2 %) de la presente invención (preparada como se ha descrito anteriormente en el presente documento y las diversas soluciones control (medio, THF y Lyc-O-Mato 7 %) se añadieron a células endoteliales coronarias humanas cultivadas confluentes (sembradas en placa en 2 ml de medio basal de célula endotelial por placa de 60 mm) durante 24 horas, después de lo cual se recogió el fluido de cultivo sobrenadante.

Análisis de nitrato y nitrito

El nitrito y nitrato (NO_x), productos oxidizados estables de óxido nítrico, se midieron en el medio de cultivo recogido 24 h después de la exposición a carotenoides usando reactivo Greiss, usando el método descrito en Miranda KM, Espey MG and Wink DA, 2001 (*Nitric Oxide* 5:62-71; "A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite").

Se realizaron experimentos a temperatura ambiente o a 37 °C en una habitación caliente, como se indica.

Análisis de peNOS

La expresión de la enzima NO sintasa endotelial, se evaluó peNOS usando el análisis de transferencia Western, también conocido en la técnica. En resumen, se cuantificó el contenido proteico de un lisado de célula endotelial usando un kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, Rockford, IL, USA). Se separaron cantidades iguales de proteínas celulares mediante 7,5 % SDS-PAGE y se sometieron a transferencia a membrana de nitrocelulosa. Después de bloqueo e incubación con el anticuerpo de peNOS primario, se cuantificaron los cambios relativos en el contenido de proteínas usando densitometría en un modo de reflectancia.

Resultados

Como se muestra en la Figura 2, cuando se usa a una concentración de 5,0 µM, la composición de bajo licopeno (2 %) de la presente invención causó un incremento significativo en el nivel de inducción de NO, cuando se compara con tanto el medio como controles de THF. Inesperadamente, Lyc-O-Mato 7 %, aunque también causa un incremento medible en la expresión de NO, era mucho menos activo a este respecto (por un factor de aproximadamente cuatro) que la composición de la presente invención.

La Figura 3 presenta los resultados obtenidos del análisis de transferencia Western de los niveles de peNOS en las células endoteliales cultivadas. Por tanto, se puede ver a partir de esta figura que la composición de bajo licopeno (2 %) de la presente invención (usada en 1,0 µM) causó inducción altamente significativa de peNOS, en comparación con tanto el medio como controles de THF. Este resultado difiere notablemente del obtenido usando Lyc-O-Mato 7 % (1,0 µM) que no causó ningún incremento en la expresión de peNOS en comparación con células no tratadas.

Se puede concluir a partir de estos resultados que la composición con baja concentración de licopeno de la presente invención es capaz de incrementar significativamente la inducción de NO en células endoteliales vasculares, y que este efecto es al menos en parte causado por la expresión incrementada de la enzima NO sintasa en dichas células. En vista de estos resultados, se puede concluir que la composición del presente sistema tiene actividad de la relevancia que se puede utilizar en el tratamiento y la prevención de diversos tipos de enfermedad cardiovascular.

Ejemplo experimental 2

Estimulación del sistema de transcripción de ARE por la composición derivada de tomate con baja concentración de licopeno de la presente invención

Los elementos de respuesta antioxidante (ARE) se identifican en promotores de gen y median una inducción transcripcional de una batería de genes que comprenden un sistema de respuesta quimioprotectora. Dicho sistema es esencial para la resistencia frente a un amplio conjunto de carcinógenos. Además, la activación de genes regulados por ARE citoprotectores puede suprimir las respuestas inflamatorias, mientras que la expresión disminuida de estos genes da como resultado enfermedad autoinmune y respuestas inflamatorias aumentadas a agresiones oxidantes. Por lo tanto, este modelo de ARE se usa también para determinar los efectos antiinflamatorios de las composiciones ensayadas.

La reivindicación del presente estudio era evaluar la actividad de una composición de oleoresina modificada con licopeno reducido (0,7 % p/p) de la presente invención, en el sistema de ARE. Los resultados obtenidos usando esta composición se compararon con aquellos obtenidos usando LycoMato (que contenía 6 % o 7 % de licopeno), presente en concentraciones molares iguales de licopeno.

Métodos y materiales:

Se usó un modelo de cultivo celular, usando células de cáncer tanto de mama (T47D) como de próstata (LnCAP), para evaluar la actividad de una composición de bajo licopeno de la presente invención, preparado como se ha

descrito anteriormente en el presente documento, sobre el sistema de ARE. Dicha composición de bajo licopeno comprendía 0,7 % de licopeno, 1,7 % de fitoeno/fitoflueno, 2,4 % de fitoesteroles y 2,5 % de vitamina E. También se ensayaron dos composiciones de alto licopeno comercialmente disponibles (LycoMato 6 % y LycoMato 7 %; fabricados por LycoRed Ltd., Be'er Sheva, Israel), con el fin de comparación.

5

Cultivo celular

Se compraron células de cáncer de próstata humana, LNCaP de la "American Type Culture Collection" (Manassas, VA, USA) y se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía piruvato de sodio (0,11 mg/ml) y DHT (10⁻⁹ M). A cada medio, se añadieron penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (0,1 mg/ml), nistatina (12,5 µg/ml), Hepes (10 mM) y FCS al 10 %.

10

La línea de célula de cáncer de mama humana, T47D, fue proporcionada amablemente por el Dr. Lafa Keydar (Tel Aviv University, Israel). Las células T47D se cultivaron en DMEM que contenía insulina (0,6 µg/ml).

15

Transfección transitoria y ensayo del gen indicador de ARE

Las células T47D se sometieron a transfección usando reactivo jet PEI (Polyplus Transfection, Illkirch, Francia) en placas de 24 pocillos (100.000 células por pocillo). Las células se aclararon una vez con el medio de cultivo apropiado sin suero, seguido de la adición de 0,45 ml de medio que contenía 3 % DCC-FCS y 50 µl de una mezcla que contenía ADN y reactivo jetPEI a una relación de carga de 1:5. La cantidad total de ADN era de 0,25 µg que contenía 0,2 µg de indicador y 0,05 µg de luciferasa de Renilla. A continuación, las células se incubaron durante 4-6 h a 37 °C en 95 % de aire/5 % de CO₂. El medio se reemplazó con uno complementado con 3 % DCC-FCS más los compuestos de ensayo, y las células se incubaron durante otras 16 h.

20

25

Las células LNCaP se sometieron a transfección usando el reactivo jetPEI. Las células (70.000) se sembraron en 1 ml de medio sin rojo fenol que contenía 3 % DCC-FCS. Al próximo día, se separaron 500 µl de medio y se añadió 50 µl de una mezcla que contenía ADN y reactivo jetPEI a una relación de carga de 1:10. La cantidad total de ADN era de 0,2 µg que contenía 0,16 µg de indicador y 0,04 µg de vectores de luciferasa de Renilla. Las células se incubaron durante 4-6 h seguido de adición de los compuestos de ensayo durante 24 h.

30

Ensayo de indicador de luciferasa para la evaluación de la actividad de ARE

Se prepararon extractos celulares para el ensayo de indicador de luciferasa (sistema de ensayo de indicador de luciferasa dual (DLR™), Promega) según las instrucciones del fabricante. El sistema de ensayo de indicador de luciferasa dual proporciona un medio eficaz de realización de los ensayos de indicador doble. En el ensayo DLR™, las actividades de las luciferasas de luciérnaga (*Photinus pyralis*) y *Renilla* (*Renilla reniformis*, también conocida como pensamiento de mar) se miden secuencialmente a partir de una muestra única. El indicador de luciferasa de luciérnaga se mide primero añadiendo el reactivo de ensayo de luciferasa II (LAR II) para generar una señal luminiscente estabilizada. Después de cuantificar la luminiscencia de luciérnaga, se para esta reacción, y la reacción de luciferasa de *Renilla* se inicia simultáneamente añadiendo el reactivo Stop & Glo® al mismo tubo. El reactivo Stop & Glo® también produce una señal estabilizadora a partir de la luciferasa de *Renilla*, la cual decae lentamente durante el transcurso de la medición.

45 Resultados

Como se muestra en la Figura 4, la composición de bajo licopeno de la presente invención induce significativamente mayor actividad de ARE que Lyc-O-Mato en las células de cáncer de próstata LNCaP, cuando se compara a concentraciones molares iguales de licopeno. El efecto observado es dependiente de la dosis. Por encima del punto de inflexión de la curva (alrededor de 10 µM) las diferencias entre la composición reivindicada en la presente y Lyc-O-Mato, con respecto a la inducción de ARE son más significativas.

50

Como se muestra en la Figura 5, se obtienen también resultados similares cuando la composición de la presente invención se añade a células de cáncer de mama T47D. Por tanto, como en el caso de los resultados obtenidos con las células de cáncer de próstata, la composición actualmente reivindicada causó actividad significativamente mayor en el sistema de ARE que la vista con los controles de Lyc-O-Mato.

55

Se puede concluir a partir de estos resultados que la composición con baja concentración de licopeno de la presente invención es un inductor altamente activo de la actividad de ARE. Por lo tanto, dicha composición tiene el potencial para influir en la maquinaria celular importante que son de gran importancia en tanto la prevención de cáncer como la reducción de la inflamación.

60

Ejemplo experimental 3**Inhibición del sistema de transcripción de NFκB por la composición derivada de tomate con baja concentración de licopeno de la presente invención**

5 La expresión de citoquinas inflamatorias así como la expresión de proteína enzimática puede estar regulada por la activación del factor nuclear kappa B (NFκB) del factor de transcripción, el cual está críticamente implicado en diversos aspectos de las enfermedades inflamatorias crónicas de patogénesis. NFκB se activa como consecuencia de la fosforilación, ubiquitinación y posterior degradación proteolítica de la proteína IκB a través de la activación de la

10 IκB quinasa (IKK). El NFκB liberado se somete a translocación dentro de los núcleos y se une a motivos en los promotores de los genes proinflamatorios tales como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y de ciclooxigenasa 2 (COX2) TNF-α, y IL-1β, conduciendo a la inducción de su expresión de ARNm. Muchos de los fármacos antiinflamatorios previamente desarrollados se han mostrado que suprimen la expresión de estos genes mediante la inhibición de la ruta de activación de NFκB. Por tanto, un inhibidor de NFκB puede ser útil como un fármaco

15 terapéutico potencial en las aplicaciones clínicas para regular las enfermedades humanas asociadas a la inflamación.

La reivindicación de este estudio era investigar si la composición de bajo licopeno de la presente invención puede inhibir el sistema de transcripción de NFκB en células de cáncer de mama T47D.

20

Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 6. A partir de esta figura se puede ver que la composición de bajo licopeno de la presente invención causa significativamente mayor inhibición del sistema de transcripción de NFκB en células de cáncer de mama T47D que el Lyc-O-Mato 6 % control. Estos resultados proporcionan además la evidencia para la actividad antiinflamatoria de alto nivel de la composición de bajo licopeno para la presente

25 invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende licopeno, uno o ambos de fitoeno y fitoflueno, y fitoesteroles, en donde la concentración de licopeno está en el intervalo del 0,3 %-2 % (p/p), en donde la relación en peso de dicho licopeno y uno o ambos de fitoeno y fitoflueno está en el intervalo de 1:1 a 1:2,5 y en donde la concentración de fitoesteroles es de al menos el 2 % (p/p).
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, comprendiendo además vitamina E a una concentración de al menos el 2 % (p/p).
- 10 3. La composición según la reivindicación 1, que comprende además uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en carotenoides adicionales, vitamina E, polifenoles y sólidos de tomate solubles.
- 15 4. La composición según la reivindicación 1, que comprende además beta-caroteno.
- 15 5. La composición según la reivindicación 1, que comprende además ácido carnósico.
- 20 6. La composición según la reivindicación 1, que comprende además sólidos de tomate solubles.
- 20 7. La composición según la reivindicación 1, en donde dicha composición se prepara a partir de tomates.
- 25 8. Un proceso para preparar una composición que comprende licopeno, uno o ambos de fitoeno y fitoflueno, y fitoesteroles como se ha definido en la reivindicación 1, comprendiendo dicho proceso las etapas de:
 - 30 a) Proporcionar un producto de tomate que comprende el 5-20 % (p/p) de licopeno;
 - b) Extraer material rico en carotenoide de dicho producto de tomate usando etanol, isopropanol, acetato de etilo o acetona a una relación mayor de 1:1 (disolvente:extracto de tomate) como el disolvente de extracción;
 - c) Calentar la mezcla de disolvente/extracto de tomate a una temperatura de aproximadamente 25-60 °C;
 - 30 d) Separar el material cristalino del disolvente por medio de separación por filtración o centrifuga; y
 - e) Evaporar el sobrenadante obtenido en la etapa (d), obteniendo de ese modo dicha composición de tomate.
9. El proceso según la reivindicación 8, en donde el disolvente es etanol.
- 35 10. El proceso según la reivindicación 8, en donde el producto de tomate es una oleorresina.
11. El proceso según la reivindicación 8, en donde el producto de tomate comprende pieles de tomate.
- 40 12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como un medicamento.
13. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como agente cosmético o cosmeceútico.

Fig. 1

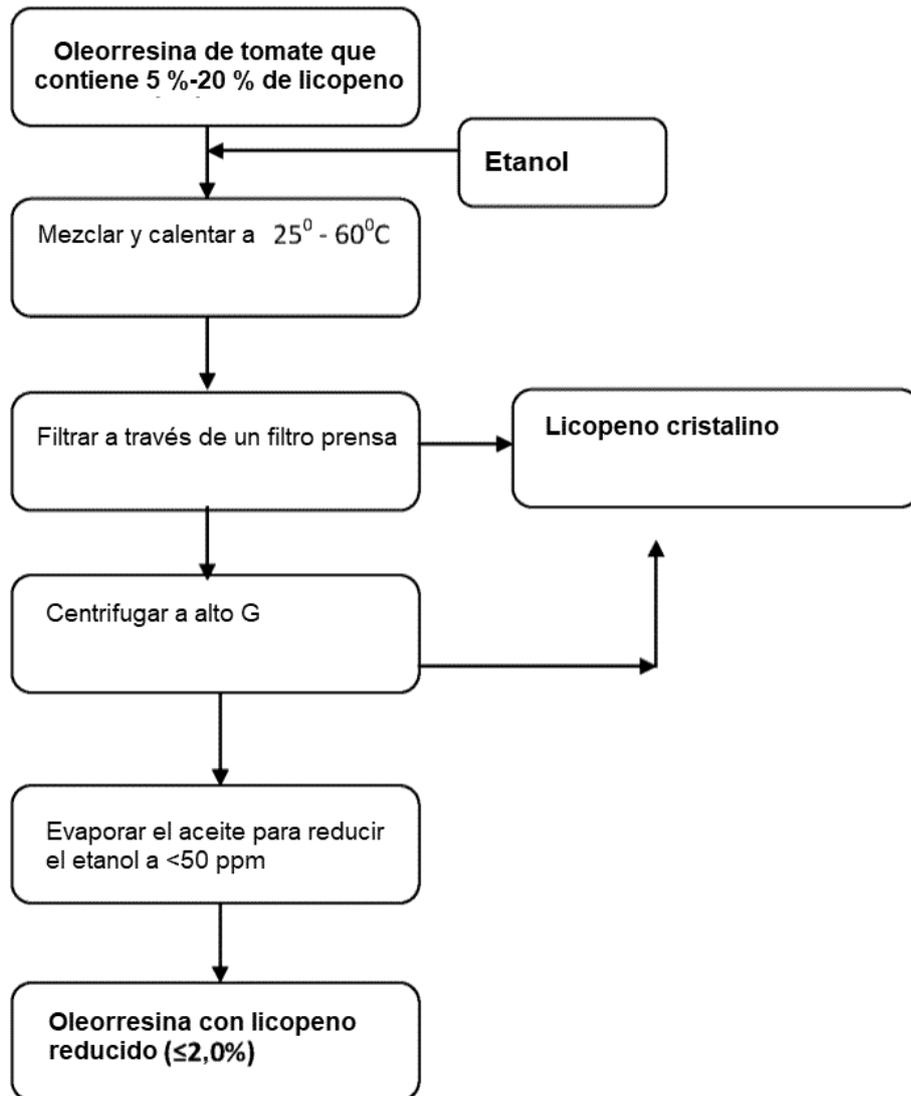


Fig. 2

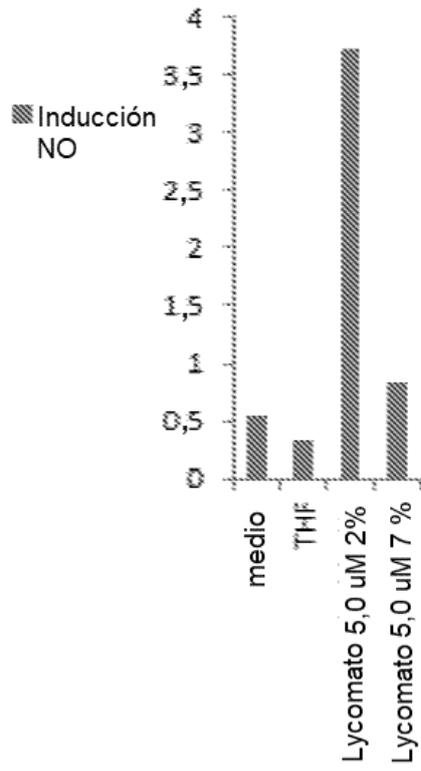


Fig. 3

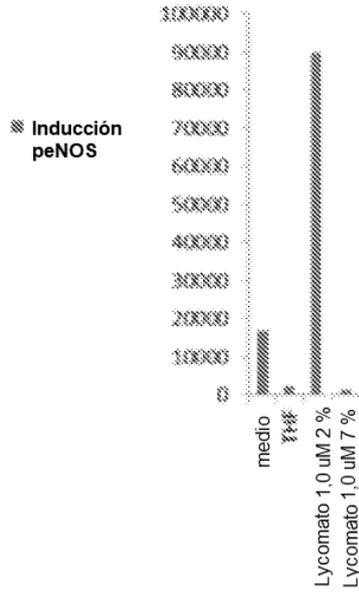


Fig. 4

Células de cáncer de próstata LNCaP

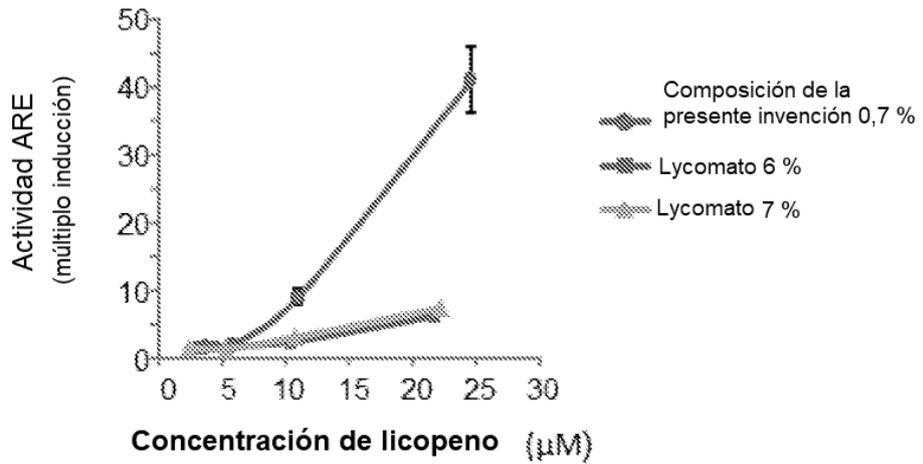


Fig. 5

Células de cáncer de mama T47D

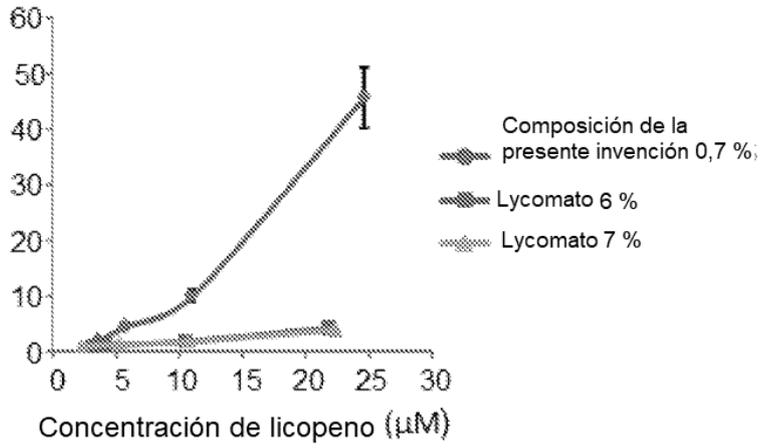


Fig. 6

