

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 520 017**

51 Int. Cl.:

A61K 36/87 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2006 E 06815967 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 1942919**

54 Título: **Procedimiento de reducción de la presión sanguínea en individuos prehipertensos y/o individuos con síndrome metabólico**

30 Prioridad:

28.09.2005 US 721720 P

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

11.11.2014

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

KAPPAGODA, CHULANI TISSA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 520 017 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

Procedimiento de reducción de la presión sanguínea en individuos prehipertensos y/o individuos con síndrome metabólico

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de prevención y/o tratamiento del síndrome metabólico y/o las afecciones que comprenden el síndrome metabólico. La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento y/o prevención de la prehipertensión. Estos procedimientos implican la administración a un mamífero, incluyendo un ser humano, de un suplemento dietético que comprende extracto de uva eficaz para el tratamiento de los individuos prehipertensos, o individuos con síndrome metabólico y/o las afecciones que comprenden el síndrome metabólico.

Antecedentes

15 La presión sanguínea es la fuerza ejercida por el torrente sanguíneo en las paredes arteriales. Se considera normal una presión sanguínea sistólica de 120 y diastólica de 80. La hipertensión se refiere a un trastorno que se caracteriza por una elevación de la presión sanguínea sistólica hasta 140 y superior y/o una elevación de la presión sanguínea diastólica hasta 90 y superior. Con hipertensión, bien hay un aumento en la resistencia vascular periférica total, tal como la debida a la vasoconstricción, o un aumento en el gasto cardíaco, o ambos. Dichas afecciones producen una elevación de la presión sanguínea, porque la presión sanguínea es igual a la resistencia de los tiempos de flujo. Hay muchos factores que pueden contribuir a tener una presión sanguínea elevada, incluyendo el estrés, la dieta y el estilo de vida, así como los daños renales, las alteraciones hormonales y los trastornos circulatorios. Un paciente hipertenso no tratado tiene un gran riesgo de desarrollar insuficiencia ventricular izquierda, infarto de miocardio, hemorragia cerebral o insuficiencia renal. La hipertensión también es un factor de riesgo para la apoplejía y la aterosclerosis coronaria. En la actualidad, los pacientes hipertensos son tratados con tratamiento farmacológico, que incluye el uso de diuréticos, bloqueadores β , inhibidores de la ECA, antagonistas de la angiotensina, bloqueadores del canal del calcio, bloqueadores α , bloqueadores α - β , inhibidores del sistema nervioso y vasodilatadores.

25 Los individuos prehipertensos se clasifican en personas que tienen la presión sistólica entre 120 y 139 mm Hg o que tienen la presión diastólica entre 81 y 89 mm Hg. Esta clasificación se basa en el Séptimo Informe del Comité Nacional Conjunto para la Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial (JNC 7), página 87, Publicación del NIH N° 04-5230. Por lo general, los individuos prehipertensos no se tratan con tratamiento farmacológico, sino que se les sugiere que adopten un estilo de vida saludable. Estas sugerencias incluyen el mantenimiento de un peso saludable; la realización de actividad física; el seguimiento de un plan de alimentación saludable haciendo hincapié en el consumo de frutas, verduras y productos lácteos bajos en grasa; la selección y preparación de alimentos con menos sodio; y el consumo de bebidas alcohólicas, en todo caso, con moderación. La adopción de hábitos de vida saludables suele ser un primer paso eficaz tanto para prevenir como para controlar la presión sanguínea anormal.

40 Muchos pacientes con hipertensión son resistentes a la insulina. La insulina estimula la captación de glucosa en los tejidos, y su capacidad para hacerlo varía mucho de un individuo a otro. Con resistencia a la insulina, los tejidos tienen una menor capacidad para responder a la acción de la insulina. Para compensar la resistencia, el páncreas secreta más insulina. Por lo tanto, los individuos resistentes a la insulina tienen altos niveles de insulina en plasma. Hay pruebas de que la presión sanguínea anormal está relacionada con el grado de resistencia a la insulina. Se desconoce la forma exacta en que se desarrolla la resistencia a la insulina, aunque se cree que la genética, la dieta y el nivel de actividad física desempeñan un papel.

45 El "síndrome metabólico", también denominado "Síndrome X", "síndrome de resistencia a la insulina" o "cuarteto de la muerte", se caracteriza por una acumulación de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, apoplejía y/o diabetes mellitus de tipo II. El síndrome metabólico puede estar causado por una sobreproducción de cortisol, una hormona del estrés, lo que provoca una acumulación de grasa en el interior de la cavidad abdominal y resistencia a la insulina. Actualmente, no se recomienda el tratamiento farmacológico para las personas con síndrome metabólico. Los factores de riesgo que caracterizan el síndrome metabólico incluyen una mayor cantidad de tejido adiposo en el interior de la cavidad abdominal (obesidad abdominal), resistencia a la insulina con un mayor riesgo de desarrollar diabetes, hiperinsulinemia, niveles elevados de grasas en sangre, aumento de la presión sanguínea y elevación de los lípidos en suero. El Panel de Tratamiento de Adultos del Programa Nacional para la Educación sobre el Colesterol de EE.UU. (ATP III) ha definido el síndrome metabólico como los individuos que tienen al menos tres de los siguientes factores de riesgo:

<u>Factor de riesgo</u>	<u>Nivel de definición</u>
Obesidad abdominal, dada como el perímetro de cintura* [†] Varones Mujeres	> 102 cm > 88 cm
Triglicéridos	≥ 150 mg/dl
Colesterol HDL Varones Mujeres	< 40 mg/dl < 50 mg/dl
Presión sanguínea	≥ 130/≥85 mm Hg
Glucemia basal	≥ 110 mg/dl [‡]
<p>*El sobrepeso y la obesidad están asociados con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. Sin embargo, la presencia de obesidad abdominal está más estrechamente relacionada con los factores de riesgo metabólico que con un IMC elevado. Por lo tanto, se recomienda medir simplemente el perímetro de cintura para identificar el componente de peso corporal del síndrome metabólico.</p> <p>[†]Algunos pacientes varones pueden desarrollar múltiples factores de riesgo metabólico cuando el perímetro de cintura aumenta solo marginalmente, por ejemplo, de 94 a 102 cm. Dichos pacientes pueden tener una potente contribución genética a la resistencia a la insulina. Ellos deberían beneficiarse de los cambios en los hábitos de vida, al igual que los varones con aumentos categóricos del perímetro de cintura.</p> <p>[‡]La Asociación Americana de la Diabetes ha establecido recientemente un punto de corte de ≥ 100 mg/dl, por encima del cual los individuos tienen bien prediabetes (glucemia basal alterada) o diabetes. Este nuevo punto de corte debería ser aplicable a la identificación del límite inferior para definir una elevación de la glucosa como uno de los criterios para el síndrome metabólico.</p>	

5 Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud define el síndrome metabólico como individuos con diabetes/resistencia a la insulina y al menos dos de los siguientes factores de riesgo: proporción alta entre la cintura y la cadera; nivel alto de triglicéridos o nivel bajo de colesterol HDL; presión sanguínea elevada; y una alta tasa de excreción urinaria de albúmina.

10 Las afecciones relacionadas con el síndrome metabólico incluyen la diabetes mellitus de tipo II, dislipoproteinemia, infarto de miocardio, apoplejía y otras enfermedades arterioscleróticas, así como los factores de riesgo para estas enfermedades, incluyendo la resistencia a la insulina en general, la obesidad abdominal causada por la acumulación de la grasa intra-abdominal, lípidos y glucosa elevados en suero sanguíneo, elevación de la presión sanguínea diastólica y/o sistólica e hipertensión.

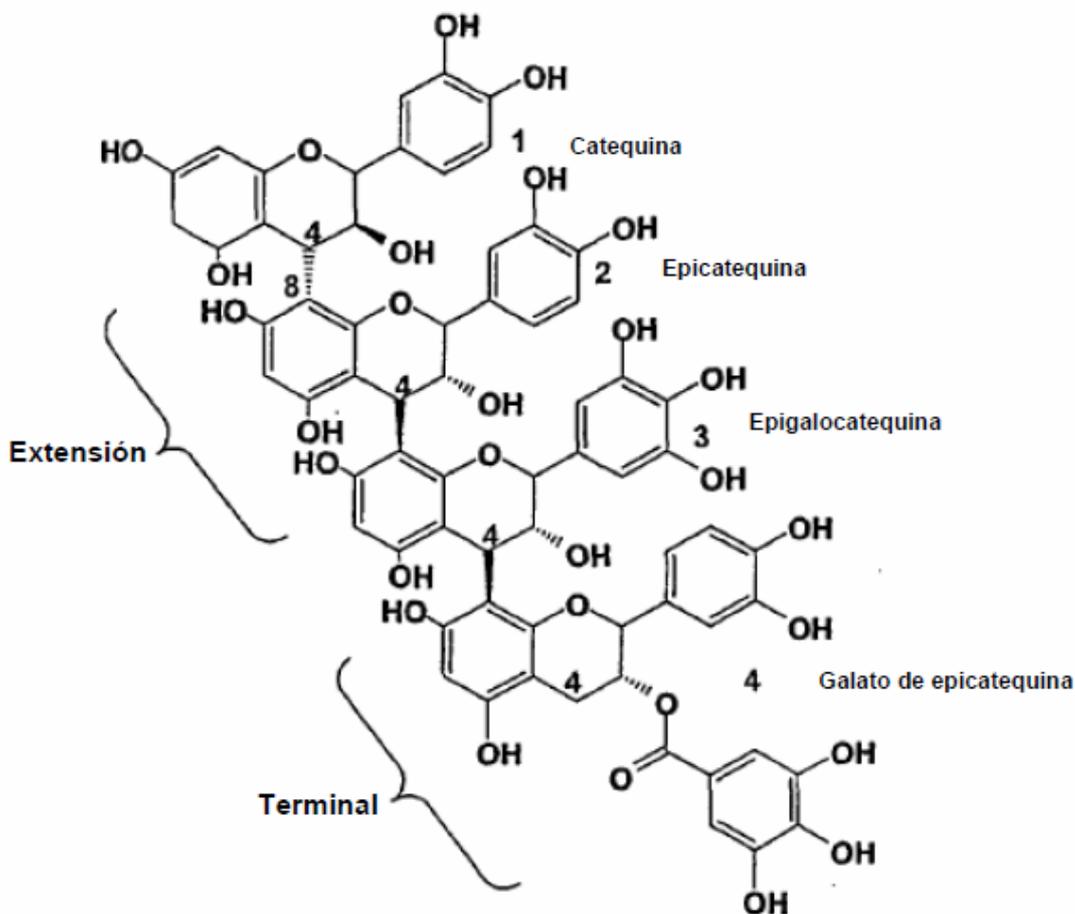
15 En el tratamiento de los individuos prehipertensos y los individuos con síndrome metabólico, se les anima a que adopten un estilo de vida saludable, que incluye mantener un peso saludable; realizar actividad física; y seguir un plan de alimentación saludable. Dado que el tratamiento farmacológico no está recomendado para estos individuos, existe la necesidad de un suplemento dietético que comprenda extracto de uva que estos individuos puedan usar como tratamiento adyuvante, que sea eficaz en la reducción de la presión sanguínea y no aumente la resistencia a la insulina.

20 Las semillas de uva contienen aproximadamente del 5 al 8 % en peso de flavonoides. Los flavonoides constituyen un grupo importante de compuestos polifenólicos de la dieta que están ampliamente distribuidos en las plantas. Se han identificado más de 4.000 flavonoides químicamente únicos de origen vegetal, tales como de frutas, verduras, legumbres, frutos secos, semillas, hierbas, especias, flores, así como de bebidas como el té, el cacao, la cerveza, el vino y el zumo de uva.

La terminología de los flavonoides con respecto a las semillas de uva se refiere a flavan-3-oles monoméricos, específicamente (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequin-3-galato. Dos o más flavan-3-oles monoméricos químicamente relacionados se denominan proantocianidinas o proantocianidinas oligoméricas ("OPC"), lo que

incluye las procianidinas y las prodelfinidinas. Las OPC que contienen dos monómeros se denominan dímeros, las de tres monómeros se denominan trímeros, las de cuatro monómeros se denominan tetrámeros, las de cinco monómeros se denominan pentámeros, etc. Operativamente, los oligómeros tienen longitudes de cadena de 2 a 7 (dímeros a heptámeros); mientras que los polímeros representan componentes con longitudes de cadena superiores a 7. Tras un largo debate, el Comité de Evaluación del Procedimiento de Siembra de la Uva (a través de la Asociación Nacional de Alimentos Nutritivos) decidió por consenso definir las OPC como todas las proantocianidinas que contienen dos o más monómeros, incluyendo polímeros o taninos condensados. Por lo tanto, los oligómeros de los extractos de uva incluyen, por ejemplo, dímeros y trímeros, y hay pruebas de que los polímeros pueden tener hasta dieciséis unidades.

A continuación, se muestra una estructura típica de una proantocianidina, que muestra las unidades de extensión y las unidades terminales del galato de epicatequina. Las unidades de extensión están representadas, por ejemplo, por los grupos de engarce de epicatequina (2) y epigalocatequina (3). Mientras que una unidad terminal está representada por el grupo galato de epicatequina (4).



Para que los compuestos polifenólicos se puedan usar a nivel comercial en forma de un extracto de uva, estos compuestos se han de separar de las uvas en una forma más concentrada. El procedimiento general en el que se extraen los compuestos polifenólicos, se purifican y se concentran a partir de uvas enteras, orujo de uva y semillas de uva se desvela en la patente de EE.UU. N° 6.544.581.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la relación entre la presión sanguínea basal y la reducción de la presión sistólica para un individuo con síndrome metabólico que se está tratando con el extracto de uva usado en la presente invención.

La Figura 2 muestra la relación entre la presión sanguínea basal y la reducción de la presión diastólica para un individuo con síndrome metabólico que se está tratando con el extracto de uva usado en la presente invención.

La Figura 3 muestra el cambio en la concentración de LDL oxidada en individuos con síndrome metabólico que se están tratando con el extracto de uva usado en la presente invención.

La Figura 4 muestra la relación entre el cambio en la concentración de LDL oxidada y la concentración basal de LDL oxidada en individuos que han recibido 300 mg del extracto de uva usado en la presente invención.

Descripción detallada

5 La presente invención proporciona un procedimiento de prevención y/o tratamiento del síndrome metabólico y/o las afecciones que comprenden el síndrome metabólico. Este procedimiento incluye la administración a un mamífero, incluyendo un ser humano, en necesidad de dicho tratamiento de un suplemento dietético que comprende una cantidad eficaz de extracto de uva. En particular, el extracto de uva usado en el presente procedimiento es eficaz para reducir la presión sanguínea y reducir el colesterol LDL oxidado en individuo con síndrome metabólico.

10 La presente invención también proporciona un procedimiento de tratamiento y/o prevención del síndrome metabólico en un mamífero, que comprende la administración de un suplemento dietético que comprende extracto de uva que tiene aproximadamente del 5 al 15 % en peso de monómeros, aproximadamente del 5 al 20 % en peso de dímeros, aproximadamente del 3 al 10 % en peso de trímeros, aproximadamente del 2 al 10 % en peso de tetrámeros y aproximadamente del 2 al 10 % en peso de pentámeros. La cantidad total de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, incluyendo monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros es aproximadamente del 25 al 50 % en peso, preferentemente aproximadamente del 25 al 40 % en peso, más preferentemente aproximadamente del 30 al 40 % en peso y más preferentemente aproximadamente del 25 al 35 % en peso. La cantidad total de compuestos fenólicos es aproximadamente del 80 % en peso o superior, y preferentemente aproximadamente del 90 % en peso o superior.

20 La presente invención también proporciona un procedimiento de prevención y/o tratamiento de la prehipertensión. Este procedimiento incluye la administración a un mamífero, incluyendo un ser humano, en necesidad de dicho tratamiento de un suplemento dietético que comprende una cantidad eficaz de extracto de uva. En particular, el extracto de uva usado en el presente procedimiento es eficaz para reducir la presión sanguínea en individuos prehipertensos.

25 La presente invención también proporciona un procedimiento de tratamiento y/o prevención de la prehipertensión en un mamífero, que comprende la administración de un suplemento dietético que comprende extracto de uva que tiene aproximadamente del 5 al 15 % en peso de monómeros, aproximadamente del 5 al 20 % en peso de dímeros, aproximadamente del 3 al 10 % en peso de trímeros, aproximadamente del 2 al 10 % en peso de tetrámeros y aproximadamente del 2 al 10 % en peso de pentámeros. La cantidad total de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, incluyendo monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros es aproximadamente del 25 al 50 % en peso, preferentemente aproximadamente del 25 al 40 % en peso, más preferentemente aproximadamente del 30 al 40 % en peso y más preferentemente aproximadamente del 25 al 35 % en peso. La cantidad total de compuestos fenólicos es aproximadamente del 80 % en peso o superior, y preferentemente aproximadamente del 90 % en peso o superior.

35 La expresión "cantidad eficaz" significa una cantidad de extracto de uva suficiente para reducir la presión sanguínea sistólica y/o la presión sanguínea diastólica en individuos prehipertensos o aquellos con síndrome metabólico en al menos aproximadamente un 2 %, preferentemente en al menos aproximadamente un 5 %, y más preferentemente en al menos aproximadamente un 8 %, sin provocar efectos adversos tales como el aumento de la resistencia a la insulina en el individuo. No obstante, un criterio de valoración clínica apropiado es una presión sanguínea sistólica por debajo de 120 mm Hg en individuos prehipertensos o en aquellos con síndrome metabólico. También se ha sugerido que el extracto de uva usado en la presente invención, además de reducir la presión sanguínea, reduce el colesterol LDL oxidado en individuos con síndrome metabólico. El aumento del colesterol LDL es un factor de riesgo reconocido para la aterosclerosis. Hay pruebas fehacientes de que la LDL modificada oxidativamente inicia el desarrollo de este proceso patológico. Por lo tanto, la reducción de la concentración de LDL oxidada puede reducir y/o prevenir la aterosclerosis en individuos con síndrome metabólico.

45 El extracto de uva usado con la presente invención tiene un perfil fenólico, determinado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase normal ("HPLC"), aproximadamente del 5 al 15 % en peso de monómeros, aproximadamente del 5 al 20 % en peso de dímeros, aproximadamente del 4 al 10 % en peso de trímeros, aproximadamente del 2 al 10 % en peso de tetrámeros y aproximadamente del 2 al 10 % en peso de pentámeros. El extracto de uva usado en la presente invención también comprende aproximadamente el 80 % en peso o más de compuestos fenólicos totales, y preferentemente aproximadamente el 90 % en peso o más, según lo determinado mediante el procedimiento Fonn Ciocalteu. El extracto de uva usado en la presente invención también comprende aproximadamente el 2 % en peso o menos de unidades terminales de galato de epicatequina, más preferentemente aproximadamente el 1 % en peso o menos, según lo determinado mediante HPLC de fase inversa tras la reacción de tiolisis. El extracto de uva usado en la presente invención también comprende aproximadamente el 12 % en peso o menos de unidades de extensión de galato de epicatequina, preferentemente aproximadamente el 8 % en peso o menos, y más preferentemente aproximadamente el 5 % en peso o menos, según lo determinado mediante HPLC de fase inversa tras la reacción de tiolisis.

El extracto de uva usado en la presente invención se pueden producir mediante la modificación del procedimiento de extracción en agua caliente desvelado en la patente de EE.UU. N° 6.544.581, como se describe a continuación. En

general, el procedimiento de extracción en agua caliente, como se describe en la patente 6.544.581, incluye las siguientes etapas. En la etapa (1), se pueden calentar semillas de uva, secas o frescas, con agua caliente durante un tiempo suficiente para extraer la mayor parte de los polifenoles. Se pueden emplear temperaturas de 60 a 100 °C, preferentemente de 71,1 a 100 °C, más preferentemente de 82,2 a 100 °C, incluso más preferentemente de 87,7 a 100 °C durante un período de aproximadamente 1 a 6 horas. El tiempo de calentamiento puede variarse en función de la temperatura usada. Generalmente, temperaturas más bajas requieren tiempos de extracción más prolongados.

En la etapa (2), se puede separar el extracto acuoso de semillas de uva en bruto de las semillas gastadas mediante drenaje a través de tamices metálicos. A continuación, se puede enfriar el extracto y tratarlo con cualquier enzima pectolítica adecuada disponible en el mercado, tal como Pectinex[®] Ultra SP-L fabricada por Novo Nordisk, a una concentración de aproximadamente 50-200 ppm para descomponer los constituyentes de la pared celular. Preferentemente, el extracto acuoso de semillas se puede tratar con la enzima durante un período de dos horas a una temperatura de de 60 a 100 °C. Como alternativa, el extracto acuoso de semillas se puede tratar con la enzima durante 7-14 días o más a una temperatura de aproximadamente 4,5 a 10 °C. En la etapa (3), el extracto de semillas turbio resultante se puede acidificar con un ácido, preferentemente un ácido mineral, más preferentemente con ácido sulfúrico, a un pH de aproximadamente 1,5 a 2,5, y dejarlo reaccionar de aproximadamente una hora a aproximadamente dos días. El extracto acidificado se puede enfriar durante hasta varias semanas para permitir que se sedimenten las macromoléculas, incluyendo proteínas y otros polisacáridos. A continuación, se puede filtrar el extracto acidificado enfriado usando tierra de diatomeas para producir un extracto de semillas aclarado. También se pueden usar otros coadyuvantes de filtración tales como la perlita.

Se puede modificar la etapa (2) de la patente 6.544.581 tratando el extracto acuoso de semillas con una enzima durante un período de cuatro a cinco días a una temperatura de aproximadamente 26,5 a 48,8 °C con el fin de producir el extracto de uva usado en la presente invención. Aunque no se pretende quedar vinculados a teoría alguna, se cree que es la prolongación de la duración usada en la patente 6.544.581 en el intervalo de temperaturas especificado de esta etapa la responsable del nuevo extracto de uva resultante. El tiempo del tratamiento enzimático se puede variar en función de la temperatura usada. En general, las temperaturas más bajas requieren tiempos de tratamiento más prolongados. Por lo tanto, se puede tratar enzimáticamente el extracto acuoso de semillas durante un máximo de dos semanas o más a temperaturas de aproximadamente 15,5 a 26,6 °C.

Como alternativa, el extracto de uva usado en la presente invención se puede producir mediante las siguientes etapas. Después de la extracción de la etapa (1) o después del tratamiento con pectinasa de la etapa (2) de la patente 6.544.581, se puede hacer un frotis del extracto sobre una placa de agar bacteriológico. Tras la incubación, pueden estar presentes varias especies de levadura, bacterias y/o hongos dependiendo del material de partida. Se puede aislar el cultivo vivo como un cóctel. Una vez aislado, el cóctel se puede usar en las etapas posteriores de extracción y/o tratamiento con enzima pectinasa. Por ejemplo, se puede tratar enzimáticamente un extracto acuoso de semillas con cualquier enzima pectolítica adecuada disponible en el mercado y combinarlo con el cóctel aislado de levadura, bacterias y/o hongos. Se puede dejar reposar la mezcla combinada durante un período de aproximadamente uno a diez días, preferentemente de aproximadamente dos a cinco días, a una temperatura de aproximadamente 21,1 a 37,7 °C. Se puede variar la duración del tratamiento enzimático en función de la temperatura usada y del recuento del inóculo. Se puede acidificar el extracto de semillas turbio resultante con un ácido adecuado como se ha descrito anteriormente a un pH de 1,5 a 2,5 y dejarlo reaccionar durante aproximadamente una hora a aproximadamente dos días. Se puede enfriar el extracto acidificado y almacenarlo durante varios días para permitir la floculación de las proteínas y los polisacáridos. A continuación, se puede filtrar el extracto acidificado frío usando tierra de diatomeas para producir un extracto de semillas aclarado, que se puede seguir procesando de acuerdo con la patente 6.544.581 para producir un extracto de uva purificado adecuado para la reducción de la presión sanguínea y la reducción de la LDL oxidada.

Se analizó mediante HPLC la cantidad de ácido gálico de los extractos de uva producidos mediante el procedimiento del documento 6.544.581 en comparación con los extractos de uva producidos mediante el procedimiento que incluye un cóctel de levadura, bacterias y/o hongos. Dicho análisis demostró un aumento de un valor de entre aproximadamente 50 y 150 ppm de ácido gálico en los extractos de uva del procedimiento del documento 6.544.581 con respecto a un valor de entre aproximadamente 400 y 1.500 ppm de ácido gálico en los extractos de uva usados en la presente invención usando el cóctel. El aumento en el ácido gálico indica que las unidades terminales y de extensión del galato de epicatequina se desesterifican de las procianidinas. Aunque no se pretende quedar vinculados a teoría alguna, se cree que el cóctel de levadura, bacterias y/o hongos usa el extracto de uva como un sustrato para el crecimiento y produce actividad de la enzima tanasa, lo que resulta en la desesterificación de las procianidinas y la liberación de ácido gálico. Como tal, el uso de un cóctel de levaduras, bacterias y/o hongos vivos produce el extracto de uva usado en la presente invención que tiene aproximadamente el 2 % en peso o menos de unidades terminales de galato de epicatequina, más preferentemente aproximadamente el 1 % en peso o menos y aproximadamente el 12 % en peso o menos de unidades de extensión de galato de epicatequina, preferentemente aproximadamente el 8 % en peso o menos, y más preferentemente aproximadamente el 5 % en peso o menos.

En una realización, se puede producir el extracto de uva de la presente invención mediante las siguientes etapas. Después de la extracción de la etapa (1) o después del tratamiento con pectinasa de la etapa (2) de la patente 6.544.581, se puede añadir cualquier enzima tanasa fúngica comercial adecuada, tal como tanino acilhidrolasa, E. C3.1.1.20, a una concentración de aproximadamente 5 a 1.000 ppm. Dependiendo de la concentración de la enzima

tanasa usada, se puede hacer reaccionar la mezcla durante aproximadamente una hora a aproximadamente dos días, preferentemente durante uno o dos días, o hasta que las unidades terminales se reduzcan hasta aproximadamente el 2 % o menos, preferentemente el 1 % o menos, y las unidades de extensión se reduzcan hasta aproximadamente el 8 % o menos, preferentemente hasta el aproximadamente 5 % o menos. Después de un tiempo de reacción suficiente, se puede acidificar el extracto hasta un pH de 1,5 a 2,5, lo que permite la floculación de las proteínas y los polisacáridos en un almacenamiento con refrigeración de 4,4 a 15,5 °C. Se puede filtrar el extracto para aclararlo y seguir procesándolo de acuerdo con la patente 6.544.581 para producir un extracto de uva con las características necesarias para la reducción de la presión sanguínea.

El extracto de uva usado en la presente invención se puede formular en suplementos dietéticos, incluyendo cápsulas, comprimidos, polvos, soluciones, geles, suspensiones, cremas, pastas, geles, supositorios, parches transdérmicos y similares. Estos suplementos dietéticos, por ejemplo, en forma de polvo o de solución, se pueden añadir a nutracéuticos, alimentos y/o bebidas para formar productos nutracéuticos, alimenticios y/o de bebida funcionales. Los suplementos dietéticos se pueden formular como polvos, por ejemplo, para mezclarlos con líquidos consumibles tales como leche, zumo, agua o geles consumibles, o jarabes para mezclarlos en otros líquidos o alimentos dietéticos. Los suplementos dietéticos de la presente invención se pueden formular con otros alimentos o líquidos para proporcionar alimentos suplementarios previamente medidos, tales como barras de una sola porción. Los productos alimenticios típicos que pueden incorporar el extracto de uva usado en la presente invención incluyen productos lácteos tales como el yogur, cereales, panes, productos alimenticios de aperitivo, zumos de frutas y otras bebidas no alcohólicas. Se pueden añadir aromatizantes, aglutinantes, proteínas, hidratos de carbono complejos, vitaminas, minerales y similares según sea necesario. Preferentemente, el extracto de uva se formula para la administración oral.

Los suplementos dietéticos usados en la presente invención están destinados a la administración diaria o según sea necesario. La magnitud de una dosis profiláctica o terapéutica del suplemento dietético en individuos prehipertensos o aquellos con síndrome metabólico variará con la gravedad de la afección que se vaya a tratar y la vía de administración. La dosis, y quizás la frecuencia de dosificación, también variarán según la edad, el peso corporal y la respuesta del individuo. En general, el intervalo total de dosis diarias, para las afecciones descritas en el presente documento, es de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1.000 mg en peso de extracto de uva administrados en dosis únicas o divididas por vía oral, tópica o transdérmica, preferentemente por vía oral. Un intervalo de dosis diarias orales preferido es de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg en peso del extracto de uva (es decir, excluyendo los excipientes y los vehículos), más preferentemente de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 300 mg. Por ejemplo, se pueden formular cápsulas o comprimidos bien en dosis de 150 mg o de 300 mg, mientras que las bebidas se pueden formular con 50 mg de extracto de uva. Dicha pauta de dosificación se mantiene preferentemente durante al menos un mes, más preferentemente durante seis meses o más.

Los suplementos dietéticos usados en la presente invención se pueden formular de una manera convencional (por ejemplo, mediante granulación en húmedo o en seco), en mezcla con vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, vitaminas, minerales y/u otros nutrientes. Los vehículos y excipientes representativos incluyen, pero sin limitación, almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares, en el caso de las preparaciones sólidas orales (tales como polvos, cápsulas y comprimidos).

Se puede emplear cualquier vía de administración adecuada para administrar los complementos dietéticos de la invención a un individuo. Las vías adecuadas incluyen, por ejemplo, oral, rectal, parenteral, intravenosa, tópica, transdérmica, subcutánea e intramuscular. Aunque se puede emplear cualquier vía de administración adecuada para proporcionar al individuo una cantidad eficaz del extracto de uva según los procedimientos de la presente invención, se prefiere la administración oral, incluyendo formas de dosificación sólidas tales como comprimidos, cápsulas o polvos. También se prefiere que el extracto de uva esté formulado para su uso en productos nutracéuticos, alimenticios y de bebida funcionales.

El extracto de uva usado en la presente invención también se puede combinar con otros agentes activos, incluyendo pero sin limitación, diuréticos, bloqueadores β , inhibidores de la ECA, antagonistas de la angiotensina, bloqueadores del canal del calcio, bloqueadores α , bloqueadores α - β , inhibidores del sistema nervioso, vasodilatadores, antioxidantes.

1. Caracterización de los extractos de uva

Recientemente, se ha informado de que el uso de polifenoles de semilla de uva no reduce la presión sanguínea sistólica, sino que, en realidad, aumenta la presión sanguínea sistólica cuando se combina con el uso de la vitamina C en individuos hipertensos. Véase Ward *et al.* "The combination of vitamin C and grape-seed polyphenols increases blood pressure: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial", *Journal of Hypertension* 2005; 23:427-434. Aunque no se pretende quedar vinculados a teoría alguna, se cree que el perfil fenólico de los extractos de uva es importante para su eficacia en la reducción de la presión sanguínea. El extracto de uva evaluado en el estudio de Ward fue Vinlife®, que tiene un perfil fenólico de compuestos fenólicos totales del 50,6 %, determinado mediante el procedimiento de Folin Ciocalteu, 11,2 % de unidades terminales de galato de epicatequina y 11,8 % de unidades de extensión de galato de epicatequina, según lo determinado mediante HPLC de fase inversa tras la reacción de

tiolisis, y un 7,3 % de monómeros, 4,4 % de dímeros, 2,0 % de trímeros, 1,9 % de tetrámeros y 1,1 % de pentámeros, con un contenido total de monómeros con respecto al de pentámeros del 16,7 %, determinado mediante HPLC de fase normal.

5 Los extractos de semilla de uva disponibles en el mercado contienen una variedad de monómeros y proantocianidinas. En la Tabla 1, se describe el perfil fenólico de algunos extractos disponibles en el mercado, determinado mediante HPLC de fase inversa, y en la Tabla 2, se describe el determinado mediante HPLC de fase normal. A partir de estos análisis, el extracto de uva usado en la presente invención (actualmente fabricado por Polyphenolics, Inc. como MegaNatural®-BP) tiene tres factores diferenciadores que lo distinguen de otros extractos de uva:

- 10 1. alto grado de pureza según lo determinado por el hecho de tener una cantidad del compuesto fenólico total superior al aproximadamente 80 % en peso, y más preferentemente superior al aproximadamente 90 % en peso, determinado mediante el procedimiento de Fonn Ciocalteu;
- 15 2. alta cantidad, por ejemplo, entre aproximadamente el 25 y el 50 % en peso, de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, siendo los compuestos fenólicos de bajo peso molecular monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros; y
3. cantidad baja o nula, por ejemplo, inferior al aproximadamente 2 %, preferentemente inferior al aproximadamente 1 %, de galato de epicatequina en unidades terminales y una pequeña cantidad, por ejemplo, inferior al aproximadamente 12 %, preferentemente inferior al aproximadamente 5 %, de galato de epicatequina en unidades de extensión.

20 Una vez más, aunque no se pretende quedar vinculados a teoría alguna, se cree que el perfil fenólico de los extractos de uva es importante para su eficacia en el tratamiento o la prevención de la prehipertensión o del síndrome metabólico en individuos. En particular, se cree que la ausencia de galato de epicatequina en unidades terminales y la pequeña cantidad de galato de epicatequina en unidades de extensión del extracto de uva usado en la presente invención, junto con la presencia de una cantidad superior de compuestos de bajo peso molecular, es responsable del aumento de la vasodilatación, lo que se cree que es responsable de la caída de la presión sanguínea en los estudios clínicos de los individuos con síndrome metabólico y prehipertensión descritos más adelante.

Procedimiento de HPLC de fase inversa para determinar el porcentaje de monómeros, oligómeros y polímeros

30 Se puede usar el análisis de HPLC de fase inversa de extracto de uva para determinar la proporción de monómeros, oligómeros y polímeros basada en el área bajo el pico a 280 nm.

Condiciones de la HPLC

Fase móvil:	A: ácido acético glacial al 2 %			
Gradiente:	B: acetonitrilo al 80 %, ácido acético al 0,4 %			
	Tiempo (min)	% A	% B	Curva
	0,00	100	0	-
	3,00	100	0	6
	6,00	96	4	6
	15,00	90	10	6
	30,00	85	15	6
	50,00	77	23	6
	60,00	75	25	6
	66,00	70	30	6
	80,00	50	50	6
	83,00	20	80	6
	85,00	100	0	6
	105,00	100	0	6
	110,00	100	0	6
Columna:	250 mm x 4,6 mm, Prodigy 5 µm ODS (3) 100A (Phenomenex, Torrance, CA)			
Caudal:	1,0 ml/min			
Longitud de onda de detección:	280 nm			
Temperatura:	30 °C			
Inyección:	25 µl			

35 *Preparación de la muestra:* se pesa con precisión 0,1 g de extracto de uva en un matraz aforado de 100 ml. Se disuelve la muestra en una pequeña cantidad de metanol (≤ 5 ml), se somete a ultrasonidos si es necesario. Se rellena hasta el volumen con 18 megaohmios de agua. Se centrifuga la muestra (14.000 rpm, 10 min) o se filtra a través de un filtro de vidrio de 0,45 µM antes de la inyección. La determinación del porcentaje en peso de monómeros, oligómeros y polímeros se basa en el área bajo el pico y en la concentración de los patrones.

Procedimiento de determinación de las unidades terminales y de extensión de las proantocianidinas basado en un análisis de HPLC tras la reacción de tiolisis

5 La tiolisis es un procedimiento para determinar el tamaño molecular medio (grado de polimerización) y la estructura básica de las proantocianidinas de los extractos de uva. La información proporcionada puede indicar la calidad biológica del extracto de uva para su absorción nutricional en el organismo.

Reactivo de tiolisis: fenilmetanotiol al 5 % (bencilmercaptano) en metanol que contiene HCl 0,2 N.

Condiciones: se mezcló solución en metanol de extracto de uva al 0,1 % con un volumen igual de reactivo de tiolisis, se agitó y se calentó hasta 90 °C durante 2 min. Se añadió agua para detener la reacción. A continuación, se centrifugó el reactivo a 14.000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se analizó directamente por HPLC.

10 *Condiciones de HPLC:*

Fase móvil:	A: ácido acético al 10 %/TFA al 0,1 %/acetonitrilo al 5 %/agua al 84,9 % (v/v/v/v)
Gradiente:	B: acetonitrilo 0-30 min B del 0 al 50 % 30-35 min B del 50 al 100 %
Columna:	150 mm x 2,0 mm de d.i., Synergi hydro-RP 80 A de 4 µm (Phenomenex, Torrance, CA)
Caudal:	3,0 ml/min
Longitud de onda de detección:	HP 1100 FLD con excitación a 276 nm y emisión a 316 nm y HP DAD a 280 nm
Temperatura:	30 °C
Inyección:	1-3 µl

15 Se disolvieron los extractos de uva por analizar en metanol, se mezclaron con un volumen igual de reactivo tiolítico y se calentaron durante 2 minutos a 90 °C. Se identificaron las unidades liberadas mediante espectrometría de masas y se determinaron cuantitativamente por HPLC en las condiciones anteriores. Se midió el grado medio de polimerización calculando la relación molar de todas las unidades de flavan-3-ol (aductos de tioéter más unidades terminales) con respecto a la catequina, la epicatequina y el galato de epicatequina. El porcentaje de unidades terminales de galato de epicatequina se determinó en base a la proporción molar del galato de epicatequina en la suma de moles totales de unidades terminales, que incluye catequina, epicatequina y galato de epicatequina. El porcentaje de unidades de extensión del galato de epicatequina se determinó en base a la relación molar de los aductos de tioéter del galato de epicatequina en la suma de moles totales de aductos de tioéter de las unidades de extensión, que incluyen aductos de tioéter de catequina, epicatequina y galato de epicatequina. Se cuantificó la cantidad total de compuestos fenólicos en términos de gramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) mediante el procedimiento de Folin Ciocalteu. Para más detalles sobre el procedimiento de análisis de Folin Ciocalteu, véase: Waterhouse, A. L., "Determination of Total Phenolics, in Current Protocols in Food Analytical Chemistry", 11.1.1-11.1.8, Wrolstad, R. E., Wiley, 2001, o Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent", *Methods in Enzymology* 1999, 299, 152-178.

20

25

TABLA 1: Características comparativas de MegaNatural®-BP y otros extractos de uva del mercado determinadas mediante HPLC de fase inversa

Origen	Denominación del producto	Fenol total g de GAE/100 g (como tal)	Galato de epicatequina		Galato de epicatequina De extensión (%)	Determinados por HPLC inversa usando el área bajo el pico		
			Terminal (%)	De extensión (%)		Monómeros (%)	Oligómeros (%)	Polímeros (%)
EE.UU.	MegaNatural®-BP	93,8	0,0	6,8	12,8	62,6	24,6	
EE.UU.	MegaNatural®-SP	91,0	0,0	5,4	9,2	69,6	21,2	
EE.UU.	MegaNatural®-BP	95,2	0,0	6,9	13,8	64,7	21,5	
EE.UU.	MegaNatural®-BP	98,6	0,0	8,2	11,3	68,0	20,7	
EE.UU.	MegaNatural®-BP	91,1	0,0	5,4	5,4	71,5	23,2	
EE.UU.	MegaNatural®-BP	95,5	0,0	5,1	6,5	73,3	20,3	
EE.UU.	MegaNatural®-BP	92,7	0,0	3,0	8,5	69,8	21,7	
EE.UU.	MegaNatural®-BP	93,5	0,0	4,8	5,4	69,9	24,7	
EE.UU.	MegaNatural Gold®	93,0	10,5	11,7	7,8	74,7	17,6	
EE.UU.	MegaNatural Gold®	91,9	4,3	14,6	12,3	76,7	11,0	
EE.UU.	MegaNatural Gold®	92,4	11,0	11,9	10,2	77,7	12,1	
EE.UU.	MegaNatural Gold®	89,1	5,2	12,9	9,9	73,7	16,4	
EE.UU.	MegaNatural Gold®	90,1	3,6	14,5	11,1	73,4	15,6	
EE.UU.	MegaNatural Gold®	90,3	2,8	8,8	13,2	65,5	21,3	
EE.UU.	MegaNatural Gold®	89,6	8,7	11,8	10,0	65,2	24,8	
Australia	Vinlife®	50,6	11,2	11,8	6,3	60,6	33,1	
Europa	Masquelier OPC®	98,0	8,5	7,5	12,1	68,4	19,5	
Europa	Naturex®	78,5	8,3	6,2	6,3	64,2	29,5	
Europa	Indena®	93,0	10,5	8,8	10,1	64,4	25,5	
China	Lycome®	88,5	10,6	7,5	5,3	63,1	31,7	

(Continuación)

Origen	Denominación del producto	Fenol total g de GAE/100 g (como tal)	Galato de epicatequina		Determinados por HPLC inversa usando el área bajo el pico		
			Terminal (%)	Extensión (%)	Monómeros (%)	Oligómeros (%)	Polímeros (%)
China	Recovery®	95,8	3,9	5,4	9,1	58,4	32,5
China	Grape P E®	92,6	9,8	6,8	3,6	51,9	44,4
China	MA®	70,1	8,7	10,5	4,6	55,3	40,1
EE.UU.	ME®	68,9	12,1	6,3	1,9	52,6	45,4
EE.UU.	San Joaquin®	74,9	17,7	6,7	2,2	56,1	41,8
EE.UU.	Activin®	84,3	14,8	11,1	3,0	55,9	41,1
Japón	KIKKOMAN®	44,5	5,2	13,1	8,1	52,9	38,9

Análisis de HPLC en fase normal para las proantocianidinas

5 *Análisis de HPLC de las proantocianidinas:* los análisis cromatográficos se realizaron en un HPLC HP de serie 1100 dotado de un automuestreador/injector, bomba binaria, calentador de columna, detector de matriz de diodos, detector de fluorescencia y HP ChemStation para la recogida y manipulación de datos. Las separaciones en fase normal de los oligómeros de proantocianidina se realizaron en una columna Phenomenex Luna de sílice (2).

Fase móvil:	A: diclorometano, metanol, agua y ácido acético (83:13:2:2 (v/v)) B: metanol, agua y ácido acético (96:2:2 (v/v))
Gradiente:	0-30 min B del 0 al 17,6 % lineal
	30-45 min B del 17,6 al 30,7 % lineal
	45-50 min B del 30,7 al 87,8 % lineal
	50-60 min B al 87,8 % lineal
Columna:	Phenomenex Luna de sílice (3,0 x 150 mm; 3,0 µm)
Caudal:	0,5 ml/min
Longitud de onda de detección:	HP 1100 FLD con excitación a 276 nm y emisión a 316 nm
Temperatura:	25 °C
Inyección:	3 µl

10 En todos los casos, la columna se re-equilibró entre las inyecciones con equivalente de 5 ml de la fase móvil inicial. Se prepararon patrones de catequina y se analizaron para establecer una curva de calibración de la respuesta a partir de la cual calcular la concentración de proantocianidinas en las muestras. Los factores de respuesta relativos de los dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros con respecto a los monómeros con detección de fluorescencia fueron publicados por R. L. Prior y L. Gu, "Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in American diet," *Phytochemistry* 2005, 66(18) 2264-2280, usando los patrones aislados y purificados a partir de granos de cacao. Estos factores de respuesta se usaron para calcular los dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros con respecto a los monómeros.

TABLA 2: Características comparativas de MegaNatural®-BP y otros extractos de uva en el mercado determinadas mediante HPLC de fase normal determinadas mediante HPLC de fase normal usando equivalente de catequina y epicatequina (% en peso)

Origen	Denominación del producto	Monómeros	Dímeros	Trímeros	Tetrámeros	Pentámeros	Monómeros con respecto a pentámeros	Otros
EE.UU.	MegaNatural®-BP	6,3	8,7	4,0	4,4	2,8	26,2	73,8
EE.UU.	MegaNatural®-BP	9,1	13,6	5,6	6,2	3,5	38,1	61,9
EE.UU.	MegaNatural®-BP	9,2	14,8	5,2	5,4	2,7	37,3	62,7
EE.UU.	MegaNatural®-BP	10,0	14,2	5,4	5,2	2,8	37,6	62,4
EE.UU.	MegaNatural®-BP	7,5	11,9	5,2	5,5	3,4	33,4	66,6
EE.UU.	MegaNatural®-BP	8,2	12,1	5,4	5,7	3,5	34,9	65,1
EE.UU.	MegaNatural®-BP	9,0	11,3	5,4	4,7	2,5	32,9	67,1
EE.UU.	MegaNatural®-BP	5,2	9,8	4,1	4,8	2,6	26,4	73,6
Australia	Vinilife®	7,3	4,4	2,0	1,9	1,1	16,7	83,3
Europa	Masquelier OPC®	15,5	14,2	6,2	4,8	2,9	43,6	56,4
Europa	Naturex®	8,3	6,4	3,6	3,0	2,0	23,2	76,8
Europa	Indena®	16,6	12,4	6,2	4,8	3,3	43,3	56,7
China	Lycome®	7,6	6,2	3,4	2,8	1,9	22,0	78,0
China	Recovery®	17,5	8,1	4,4	2,8	2,0	34,8	65,2
China	Grape P E®	3,9	3,2	1,9	1,5	1,1	11,6	88,4
China	MA®	4,1	3,8	1,9	1,7	0,8	12,3	87,7
EE.UU.	ME®	1,8	1,8	0,9	0,8	0,5	5,8	94,2
EE.UU.	San Joaquin®	5,3	5,8	2,6	1,8	1,3	16,8	83,2
EE.UU.	Activin®	5,5	4,8	2,1	1,3	1,3	15,1	84,9
Japón	KIKKOMAN®	0,9	1,1	0,7	0,7	0,4	3,7	96,3

Los resultados expuestos en las Tablas 1 y 2 se obtuvieron usando diferentes procedimientos, que representan los diferentes intervalos, por ejemplo, del porcentaje de monómeros. Por ejemplo, la HPLC de fase inversa se usó para determinar el porcentaje de monómeros, oligómeros y polímeros en base a las áreas bajo los picos de estos tres grupos de compuestos. El ácido galaico se incluye en forma de monómeros. En la HPLC de fase normal, se usaron la catequina y la epicatequina como patrones para determinar la cantidad en peso de monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros del extracto de uva. Los factores de respuesta relativos de dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros con respecto a los monómeros publicados por R. L. Prior y L. Gu se usaron para calcular los dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros.

2. Efecto del extracto de uva en la presión sanguínea de los individuos con síndrome metabólico

Los efectos del extracto de uva usado en la presente invención sobre la presión sanguínea se estudiaron en veinticuatro individuos con diagnóstico de síndrome metabólico. El estudio incluyó un número igual de varones y mujeres con edades comprendidas entre los 20 y 50 años. El síndrome metabólico fue diagnosticado en base a los criterios definidos por el Panel III de Tratamiento de Adultos del Programa Nacional para la Educación sobre el Colesterol de EE.UU. Cada sujeto presentaba al menos tres de las siguientes características: 1) Glucemia basal de > 110 mg/dl; 2) HDL (< 40 mg/dl en varones y < 45 mg/dl en mujeres); 3) presión sanguínea > 130/85; y 4) obesidad abdominal (> 102 cm en varones y > 88 cm en mujeres). Se excluyeron los individuos fumadores o exfumadores (< 3 años); los que estaban tomando fármacos antiinflamatorios o contra la hipertensión; o los consumidores de compuestos antioxidantes sin receta médica.

Se repartieron los individuos aleatoriamente en bloques en tres grupos de ocho y se les administró una de las siguientes cápsulas en función del grupo asignado.

- El grupo 1 recibió una cápsula de placebo;
- el grupo 2 recibió una cápsula que contenía 150 mg de extracto de uva;
- el grupo 3 recibió una cápsula que contenía 300 mg de extracto de uva.

Los individuos recibieron suficientes cápsulas para tomar la misma dosis una vez al día durante los veintiocho días siguientes. Al final de este período, se realizaron mediciones de la presión sanguínea. Se registraron las presiones sanguíneas ambulatorias durante un período de 12 horas al inicio del estudio y otra vez después de cuatro semanas. El procedimiento no fue invasivo y consistió en colocar un manguito de presión sanguínea en la parte superior del brazo y conectar el manguito a un dispositivo de inflado automático autorizado por la FDA, que se colocó en un cinturón.

La Tabla 3 muestra los datos de presión sanguínea para los tres grupos de individuos con síndrome metabólico. En los que recibieron 300 mg y 150 mg al día del extracto de uva usado en la presente invención, se produjeron reducciones significativas tanto en la presión sistólica como en la diastólica. No hubo cambios significativos en el grupo que recibió el placebo.

Tabla 3. Resultados del extracto de uva usado en la presente invención sobre la presión sanguínea de individuos con síndrome metabólico

	300 mg al día		150 mg al día		Placebo	
	Sistólica	Diastólica	Sistólica	Diastólica	Sistólica	Diastólica
Inicio	129 ± 4	79 ± 3	137 ± 4	84 ± 3,3	124 ± 4	74 ± 4
4 semanas	117 ± 3	71 ± 3	125 ± 4	78 ± 1,9	123 ± 4	71 ± 4
p*	0,007	0,006	0,003	0,009	n.s.	n.s.
*p es la probabilidad de que los valores iniciales y finales sean iguales. En general, se considera significativo un valor de p de 0,05 o inferior (5 %).						

En las Figuras 1 y 2, se muestra la relación entre la presión sanguínea basal y la caída tanto de la presión sistólica como de la presión diastólica. La presión sanguínea se ofrece en mm Hg. Dado que el diagnóstico del síndrome metabólico se basa en la presencia de tres de los factores de riesgo enumerados (uno de los cuales es la presión sanguínea), el estudio no distribuyó aleatoriamente en bloques a los individuos en cuanto a la presión sanguínea. Como tales, las presiones medias no fueron similares en los tres grupos (pero variaron en un intervalo estrecho).

Este estudio demuestra que el extracto de uva de la presente invención a las dosis diarias de 150 mg y 300 mg reduce la presión sanguínea tanto sistólica como diastólica en individuos con síndrome metabólico. La caída de la presión sanguínea es estadísticamente significativa para ambas dosis del extracto usado. De hecho, los cambios observados en la presión sanguínea con el uso del extracto de uva fueron comparables a los observados en los principales ensayos clínicos en los que se usaron agentes farmacéuticos.

3. Efecto del extracto de uva sobre la LDL oxidada de individuos con síndrome metabólico

Los efectos del extracto de uva usado en la presente invención sobre la LDL oxidada se estudiaron en los mismos veinticuatro individuos diagnosticados con síndrome metabólico descritos anteriormente. Se midió la concentración de LDL oxidada al inicio del estudio y, de nuevo, después de cuatro semanas de tratamiento. Para medir la concentración de LDL oxidada, se tomó una muestra de sangre de cada individuo y se analizó.

En la Figura 3, se resumen los cambios en la concentración de la LDL oxidada para los tres grupos. La Figura 3 muestra un ligero descenso de la LDL oxidada para el placebo, una tendencia descendente en la LDL oxidada para los individuos que tomaron 150 mg del extracto de la uva usado en la presente invención y una caída estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la LDL oxidada para los individuos que tomaron 300 mg del extracto de uva usado en la presente invención. La Figura 4 representa la relación entre el cambio en la LDL oxidada y la concentración basal de LDL oxidada en individuos que recibieron 300 mg del extracto de uva usado en el estudio. El coeficiente de regresión fue $R^2 = 0,52$. La Figura 4 muestra una mayor caída en la concentración de LDL oxidada en individuos que comenzaron con los niveles más altos de LDL oxidada para empezar.

Este estudio demuestra que el extracto de uva de la presente invención a dosis diarias de 150 mg y 300 mg reduce la concentración de LDL oxidada en plasma en los individuos con síndrome metabólico. Además, se produjo una reducción estadísticamente significativa en la concentración de LDL oxidada para aquellos individuos que recibieron 300 mg del extracto de uva usado en la presente invención.

4. Efecto del extracto de uva en individuos con prehipertensión

Los efectos del extracto de uva usado en la presente invención se estudiaron en veinticuatro individuos diagnosticados con prehipertensión. El estudio incluyó un número igual de varones y mujeres con edades comprendidas entre los 30 y 60 años. La prehipertensión fue diagnosticada en base a los criterios definidos por el Séptimo Informe del Comité Nacional Conjunto de Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial. Cada sujeto tenía una presión sistólica de entre 120 y 139 mm Hg y/o una presión diastólica de entre 81 y 89 mm Hg. Se excluyeron los individuos fumadores o exfumadores (< 3 años); los que estaban tomando fármacos antiinflamatorios o contra la hipertensión; o los consumidores de compuestos antioxidantes sin receta médica.

Se repartieron los individuos aleatoriamente en bloques por género en dos grupos de doce y se les administró una de las siguientes cápsulas en función del grupo asignado.

- El grupo 1 recibió una cápsula de placebo;
- el grupo 2 recibió una cápsula que contenía 300 mg de MegaNatural®-BP.

Los individuos recibieron suficientes cápsulas para tomar la misma dosis una vez al día durante las siguientes ocho semanas. Al final de este período, se realizaron mediciones de la presión sanguínea. Se registraron las presiones sanguíneas ambulatorias durante un período de 12 horas al inicio del estudio y otra vez después de ocho semanas. El procedimiento no fue invasivo y consistió en colocar un manguito de presión sanguínea en la parte superior del brazo y conectar el manguito a un dispositivo de inflado automático autorizado por la FDA, que se colocó en un cinturón.

La Tabla 4 muestra los datos de presión sanguínea para los dos grupos de individuos con prehipertensión. Las presiones basales entre los dos grupos no fueron significativamente diferentes. En los que recibieron 300 mg diarios del extracto de uva usado en la presente invención, se produjeron reducciones significativas en la presión tanto sistólica como diastólica. Sin embargo, no se produjeron cambios significativos en el grupo que recibió placebo. Por ejemplo, la reducción media de la presión sanguínea sistólica en el grupo tratado con MegaNatural®-BP fue de $7,2 \pm 2,5$ mm Hg, mientras que la presión sanguínea sistólica en el grupo de placebo aumentó en $0,03 \pm 1,5$ mm Hg. Los datos se resumen a continuación. Los valores se ofrecen en mm Hg (media \pm ETM).

Tabla 4. Resultados de MegaNatural®-BP sobre la presión sanguínea de individuos con prehipertensión

	300 mg de MegaNatural®-BP al día		Placebo	
	Sistólica	Diastólica	Sistólica	Diastólica
Inicio	133 \pm 2	80 \pm 2	134 \pm 2	79 \pm 2
8 semanas	126 \pm 2	73 \pm 2	134 \pm 2	80 \pm 2
p*	0,021	0,042	n.s.	n.s.

*p es la probabilidad de que los valores iniciales y finales sean iguales. En general, se considera significativo un valor de p de 0,05 o inferior (5 %).

Este estudio demuestra que el extracto de uva de la presente invención a la dosis diaria de 300 mg reduce la presión sanguínea tanto sistólica como diastólica en individuos con prehipertensión. La caída de la presión sanguínea es estadísticamente significativa. De hecho, los cambios observados en la presión sanguínea con el uso de extracto de uva fueron comparables a los observados en los principales ensayos clínicos en los que se usaron agentes farmacéuticos.

La invención se define además por referencia a los siguientes ejemplos que describen un procedimiento de fabricación del extracto de uva y de preparación de los suplementos dietéticos. Los ejemplos son representativos, y no se han de interpretar como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Procedimiento de fabricación del extracto de uva

Se extrajeron semillas de uva secas con agua a una temperatura de 93,3 °C durante dos horas y se separó el extracto de las semillas sobre tamices metálicos. Se enfrió el extracto hasta una temperatura de 32,2 a 37,7 °C, y se añadió pectinasa a una concentración de 200 ppm. Se dividió el extracto en dos porciones. A una porción, se añadió enzima tanasa fúngica comercial (tanino acilhidrolasa, E.C3.1.1.20) a una concentración de 1.000 ppm. A la segunda porción, la tanasa se añadió a una concentración de 50 ppm. La concentración residual de ácido gálico en el extracto original era de 117 ppm con 18,9 % de unidades terminales y 11,1 % de unidades de extensión. En aproximadamente dos horas de tratamiento con 1.000 ppm de enzima tanasa, la concentración de ácido gálico ascendió a 904 ppm con un 0 % de unidades terminales y aproximadamente un 5,5 % de unidades de extensión. Se requirieron aproximadamente treinta y cuatro horas de tratamiento con 50 ppm de enzima tanasa para que el ácido gálico ascendiera a 810 ppm con menos del 1 % de unidades terminales y menos del 6 % de unidades de extensión. Después de aproximadamente dos días, se acidificaron ambos extractos a un pH de 1,5 a 2,5, lo que permitió la floculación de las proteínas y los polisacáridos en un almacenamiento con refrigeración de 4,4 a 15,5 °C. El extracto se filtró y se procesó adicionalmente de acuerdo con la patente 6.544.581 para producir un extracto de uva con características que permitieran la reducción de la presión sanguínea y la reducción de las concentraciones de LDL oxidada.

Ejemplo 2: Cápsulas

Se mezcló en seco extracto de uva MegaNatural®-BP (150 mg o 300 mg) con estearato de magnesio (3 mg o 6 mg, respectivamente) y se cargó en cápsulas de gelatina con cubierta dura (hechas de gelatina y agua). En la formulación de 150 mg, el extracto de uva tenía un mínimo del 90 % de fenoles o 135 mg de fenoles por 150 mg de extracto de uva. En la formulación de 300 mg, el extracto de uva tenía un mínimo del 90 % de fenoles o 270 mg de fenoles por 300 mg de extracto de uva. La dosis diaria es de una cápsula al día.

Ejemplo 3: Polvo

Se formuló extracto de uva MegaNatural®-BP en una mezcla seca con los excipientes mostrados en la Tabla 4 para su uso en una bebida, en la que los ingredientes se mezclaron en seco. Para preparar la bebida final, se combinaron 9,47 g de la mezcla seca con 500 ml de agua fría y se agitaron. Una porción de 500 ml contiene 16 calorías. La bebida final contiene 100 mg de extracto de uva MegaNatural®-BP y 120 mg de vitamina C por cada porción de 1 l, que tendrá un valor de ORAC de 2.200 ET.

La CARO, medida en micromoles equivalentes de Trolox (ET) (un derivado de tocoferol hidrosoluble no comercial) por gramo, significa "Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno". Se trata del patrón mediante el cual los científicos miden la actividad antioxidante de los alimentos y los suplementos. Una sola ración de frutas y verduras frescas o recién cocinadas proporciona una media de 600 a 800 unidades de CARO. Se ha sugerido que el aumento de la ingesta de alimentos o suplementos que proporcione de 2.000 a 5.000 unidades de CARO al día puede ser beneficioso para la salud.

TABLA 4

Ingredientes	% de mezcla en seco (g)
Maltodextrina	37,48
Ácido cítrico	29,99
Agente enturbador (Goma de pureza 2000)*	5,25
Aspartamo	3,85
Citrato sódico, Calidad FCC	3,75
Ultra Guar**	3,75
Aroma de naranja N&A (SN313897)***	7,5
Aroma de fruta de la pasión Nat FF (SN 313898)***	4,27
Amarillo FD&C N° 6 (20:1 en maltodextrina)	2,24
Amarillo FD&C N° 5(20:1 en maltodextrina)	0,75

(Continuación)

<u>Ingredientes</u>	<u>% de mezcla en seco (g)</u>
Ácido ascórbico	0,64
Extracto de uva MegaNatural®-BP (Polyphenolics, Inc.)	0,53
TOTAL	100
*Disponible en National Starch & Chemical Corporation, Bridgewater, NJ **Disponible en P.L. Thomas & Co., Inc. Morristown, NJ ***Disponible en International Flavors & Fragrances, Dayton, NJ	

Ejemplo 4: Bebidas

- 5 Se formuló extracto de uva MegaNatural®-BP en una bebida con los excipientes mostrados en la Tabla 5. La siguiente bebida contiene 50 mg de extracto de uva MegaNatural®-BP y 60 mg de vitamina C (100 % de la CDR) por cada ración de 236,59 ml. En una ración de 236,59 ml, la bebida contiene 0 calorías y 0,15 g de hidratos de carbono totales. Una ración de 473,18 ml tendría un valor de CARO de 2.200 ET.

TABLA 5

<u>Ingredientes</u>	<u>% en peso</u>
Agua	99,4373
Ácido cítrico	0,2640
Color púrpura MegaNatural (Conc. de Canandaigua)	0,0528
Sistema de aromas de Sethness - Greenleaf	0,0867
Benzoato de sodio	0,0448
Sorbato de potasio	0,0448
Ácido ascórbico	0,0338
Extracto de uva MegaNatural®-BP (Polyphenolics, Inc.)	0,0211
Asparatamo	0,0147
TOTAL	100,0000 %

10 Ejemplo 5: Bebidas

Se formuló extracto de uva MegaNatural®-BP en una bebida con los excipientes mostrados en la Tabla 6. La siguiente bebida contiene 50 mg de extracto de uva MegaNatural®-BP y 60 mg de vitamina C (100 % de la CDR) por cada ración de 236,59 ml. En una ración de 236,59 ml, la bebida contiene 15 calorías y 4 g de hidratos de carbono totales. Una ración de 473,18 ml tendría un valor de CARO de 2.200 ET.

15

TABLA 6

<u>Ingredientes</u>	<u>% en peso</u>
Agua	95,8778
Concentrado de zumo de naranja 65	1,3973
Concentrado de zumo de arándano 50	0,8691
Color púrpura MegaNatural (Conc. de Canandaigua)	0,5032
Sistema de aromas de Sethness - Greenleaf	1,1074
Benzoato de sodio	0,0444
Sorbato de potasio	0,0444
Ácido ascórbico	0,0357
Extracto de uva MegaNatural®-BP (Polyphenolics, Inc.)	0,0210
Neotame (The NutraSweet Co.)	0,0997
TOTAL	100,0000 %

Ejemplo 6: Suplemento de vitaminas/minerales

Se mezcló en seco extracto de uva MegaNatural®-BP (150 mg) con los siguientes excipientes enumerados en la Tabla 7 y se prensaron en un comprimido para formar un suplemento multivitamínico/mineral. La dosis diaria es de un comprimido al día, preferentemente tomado con comida.

5

TABLA 7

Ingredientes	% de valor diario
3.500 UI de vitamina A (29 % en forma de betacaroteno)	70
60 mg de vitamina C	100
400 UI de vitamina D	100
45 UI de vitamina E	150
10 µg de vitamina K	13
1,5 mg de tiamina	100
1,7 mg de riboflavina	100
20 mg de niacina	100
3 mg de vitamina B6	150
400 µg de ácido fólico	100
25 µg de vitamina B12	417
30 µg de biotina	10
10 mg de ácido pantoténico	100
299 mg de calcio	20
48 mg de fósforo	5
150 µg de yodo	100
100 mg de magnesio	25
15 mg de cinc	100
20 mg de selenio	29
2 mg de cobre	100
2 mg de manganeso	100
150 µg de cromo	125
75 µg de molibdeno	100
72 mg de cloruro	2
80 mg de potasio	2
150 mg de extracto de uva MegaNatural®-BP	*
150 µg de boro	*
5 µg de níquel	*
2 mg de silicio	*
10 µg de vanadio	*
250 µg de luteína	*
300 µg de licopeno	*
*Valor diario (% VD) no establecido	

Ejemplo 7: Suplemento de vitaminas/minerales

Se mezcló extracto de uva MegaNatural®-BP (150 mg) con los siguientes ingredientes y excipientes enumerados en la Tabla 8 en un mezclador en V hasta formar una mezcla uniforme. Se comprimió la mezcla en comprimidos hasta alcanzar un peso específico de 775 mg ± 2 %, formándose un suplemento multivitamínico/mineral. Se recubrieron los comprimidos por pulverización con un recubrimiento transparente de una goma hidrosoluble tal como hidroxipropilmetilcelulosa, y se secaron. La dosis diaria es de un comprimido al día. El tamaño del lote para la formulación de la Tabla 8 es de 500.000 comprimidos.

10

TABLA 8

<u>Ingredientes (Unidades de medida)</u>	<u>Etiqueta</u>	<u>Exceso (%)*</u>	<u>Cantidad/ Comprimido (mg)</u>	<u>Cantidad/ Lote (kg)</u>
Palmitato de vitamina A a 500 K UI/g (UI)	5000 UI	30	13,000	6,500
Vitamina D ₃ a 850K UI/g (UI)	400 UI	30	0,612	0,306
Succinato de vitamina E (D-α) a 1.210 UI/g (UI)	15 UI	5	13,017	6,508
Vitamina C (mg)	30 mg	2	30,600	15,300
HCl de tiamina al 89,2 % (mg)	1,5 mg	2	1,715	0,858
Riboflavina (mg)	1,7 mg	2	1,734	0,867
Niacinamida (mg)	10 mg	2	10,200	5,100
HCl de piridoxina al 82,3 % (mg)	2 mg	5	2,552	1,276
Ácido fólico triturado al 1,0 % (µg)	400 µg	25	50,000	25,000
Vitamina B-12 triturada al 1,0 % (µg)	6 µg	20	0,720	0,360
Ácido pantoténico (Cal Pan.) (mg)	10 mg	5	10,500	5,250
Biotina triturada al 1,0 % (µg)	30 µg	20	3,600	1,800
Calcio (fosfato dicálcico) al 29,46 % (mg)	100 mg	0	344,119	172,060
Fósforo (fosfato dicálcico) al 22,77 % (mg)	75 mg	0	0,000	0,000
Magnesio (MgO) al 60,32 % (mg)	20 mg	0	33,156	16,578
80,34 (mg) de cinc (ZnO)	5 mg	0	6,224	3,112
Yodo (KI) al 76,45 % (µg)	150 µg	0	0,196	0,098
Cobre (Gluconato) al 14,00 % (mg)	2 mg	0	14,286	7,143
Manganeso (Gluconato) al 12,34 % (mg)	2 mg	0	16,207	8,104
Extracto de uva MegaNatural®-BP	150 mg		150,000	25,000
Celulosa microcristalina			33,750	16,875
Croscarmelosa de sodio			20,250	10,125
Ácido esteárico			13,500	6,750
Estearato de magnesio			5,063	2,531
TOTAL			775,000	337,500
*Porcentaje de la cantidad de ingrediente por encima de la etiqueta usado para alcanzar la cantidad de la etiqueta.				

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un extracto de polifenoles procedente de la uva para su uso en el tratamiento y/o la prevención del síndrome metabólico o la prehipertensión en un mamífero en necesidad de ello, en la que el extracto comprende aproximadamente el 2 % en peso o menos de unidades terminales de galato de epicatequina y en la que un individuo adulto que padece prehipertensión tiene una presión sistólica de entre 120 y 139 mm Hg o una presión diastólica de entre 81 y 89 mm Hg.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el extracto de polifenoles procedente de la uva está en una cantidad eficaz para reducir la presión sanguínea y/o para reducir el colesterol LDL oxidado.
- 10 3. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el extracto de polifenoles comprende entre aproximadamente el 5 y el 15 % en peso de monómeros, entre aproximadamente el 5 y el 20 % en peso de dímeros, entre aproximadamente el 3 y el 10 % en peso de trímeros, entre aproximadamente el 2 y el 10 % en peso de tetrámeros y entre aproximadamente el 2 y el 10 % en peso de pentámeros.
- 15 4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la cantidad total de monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros es aproximadamente de entre el 25 y el 50 % en peso.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el extracto comprende aproximadamente el 80 % en peso o más de compuestos fenólicos totales.
- 20 6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el extracto comprende aproximadamente el 12 % en peso o menos de unidades de extensión de galato de epicatequina.
7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la cantidad de extracto de la composición es de entre aproximadamente 50 y 1.000 mg.
- 25 8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el extracto de polifenoles contiene de 400 a 1.500 ppm de ácido gálico.
9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se formula para la administración oral.
- 30 10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se administra en una forma seleccionada del grupo que consiste en comprimidos, polvos, líquidos, cápsulas y geles.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la composición se usa en un producto nutracéutico, un producto alimenticio o una bebida.
- 35 12. Uso de una composición que comprende un extracto de polifenoles procedente de la uva para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención del síndrome metabólico o la prehipertensión en un mamífero en necesidad de ello, en el que el extracto comprende aproximadamente el 2 % en peso o menos de unidades terminales de galato de epicatequina y en el que un individuo adulto que padece prehipertensión tiene una presión sistólica de entre 120 y 139 mm Hg o una presión diastólica de entre 81 y 89 mm Hg.
- 40 13. Una composición que comprende un extracto de polifenoles procedente de la uva que tiene aproximadamente del 5 al 15 % en peso de monómeros, aproximadamente del 5 al 20 % en peso de dímeros, aproximadamente del 3 al 10 % en peso de trímeros, aproximadamente del 2 al 10 % en peso de tetrámeros y aproximadamente del 2 al 10 % en peso de pentámeros para su uso en el tratamiento y/o la prevención del síndrome metabólico o la prehipertensión en un mamífero en necesidad de ello, en el que el extracto comprende aproximadamente el 2 % en peso o menos de unidades terminales de galato de epicatequina y en el que un individuo adulto que padece prehipertensión tiene una presión sistólica de entre 120 y 139 mm Hg o una presión diastólica de entre 81 y 89 mm Hg.
- 45 14. Uso de una composición que comprende un extracto de polifenoles procedente de la uva que tiene aproximadamente del 5 al 15 % en peso de monómeros, aproximadamente del 5 al 20 % en peso de dímeros, aproximadamente del 3 al 10 % en peso de trímeros, aproximadamente del 2 al 10 % en peso de tetrámeros y aproximadamente del 2 al 10 % en peso de pentámeros para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención del síndrome metabólico o la prehipertensión en un mamífero en necesidad de ello, en el que el extracto comprende aproximadamente el 2 % en peso o menos de unidades terminales de galato de epicatequina y en el que un individuo adulto que padece prehipertensión tiene una presión sistólica de entre 120 y 139 mm Hg o una presión diastólica de entre 81 y 89 mm Hg.
- 50

15. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el mamífero es un ser humano.

Figura 1: Cambios en la presión sanguínea sistólica

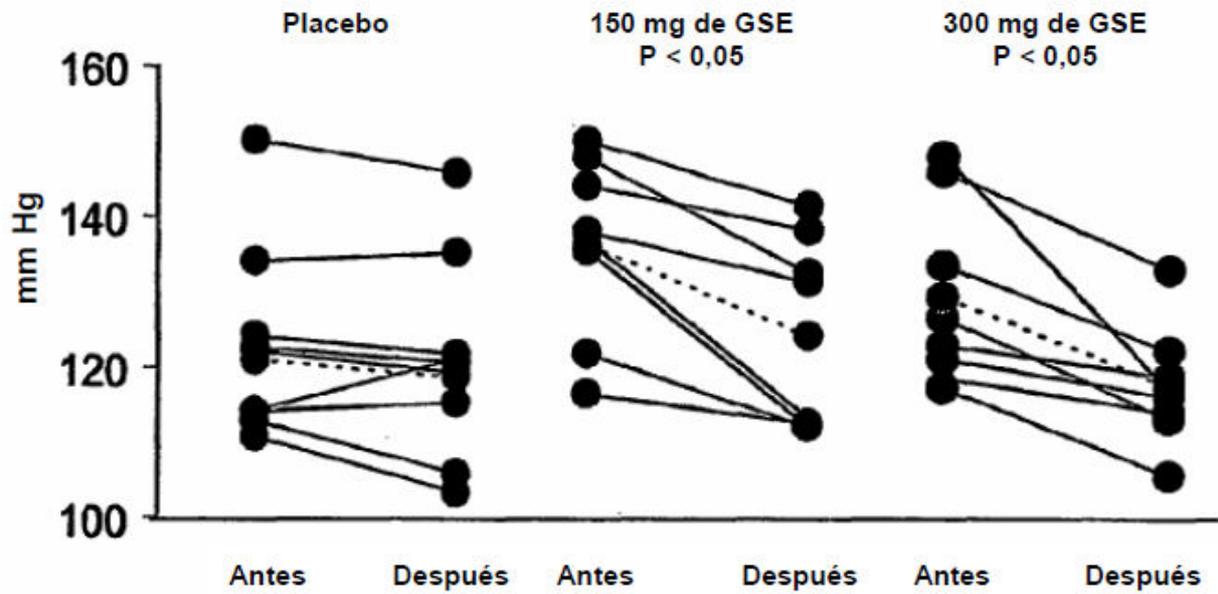


Figura 2: Cambios en la presión sanguínea diastólica

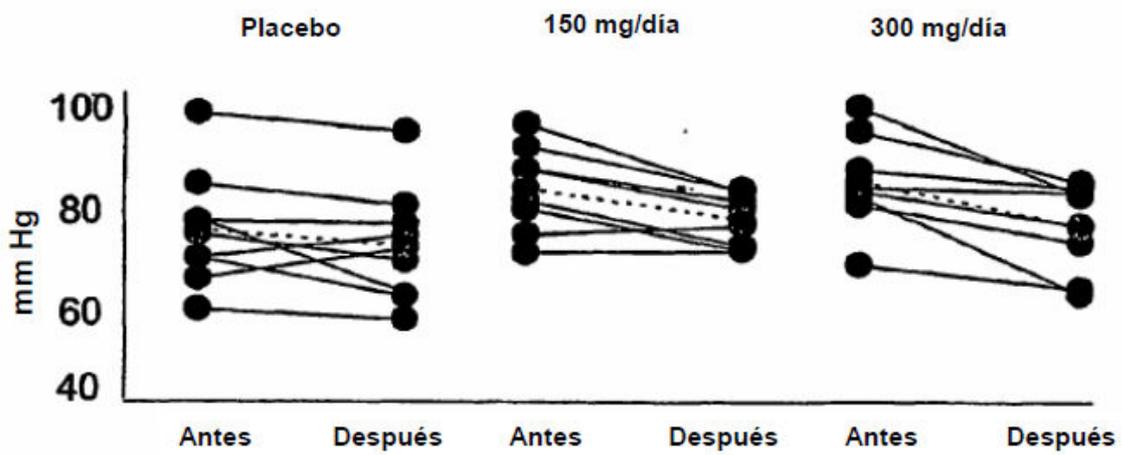


Figura 3: Cambios en la LDL oxidada

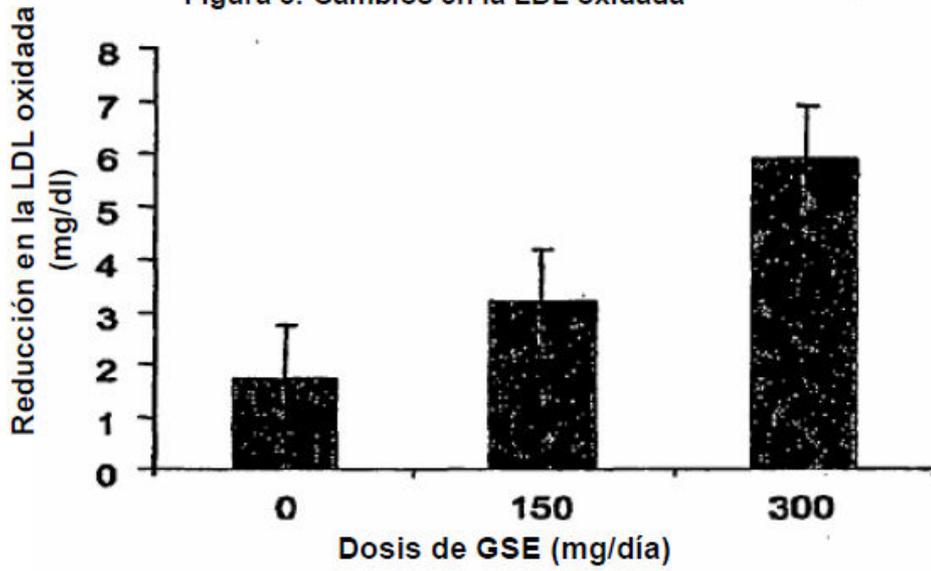


Figura 4: Relación entre el cambio en la LDL oxidada y la concentración basal de LDL oxidada (300 mg de MegaNatural®BP)

