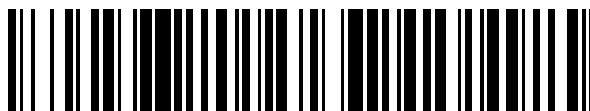


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 713**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A23L 2/39 (2006.01)

A23L 2/52 (2006.01)

A61K 36/87 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2006 E 06804230 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 1937091**

54 Título: **Extracto de uva, suplemento en la dieta del mismo y procedimiento de preparación**

30 Prioridad:

28.09.2005 US 721721 P

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

10.08.2015

73 Titular/es:

**CONSTELLATION BRANDS, INC. (100.0%)
207 High Point Drive, Building 100
Victor, NY 14564, US**

72 Inventor/es:

**SHRIKHANDE, ANIL J.;
WANG, HAIBO y
KUPINA, STEVE A.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 542 713 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

Extracto de uva, suplemento en la dieta del mismo y procedimiento de preparación

Campo de la invención

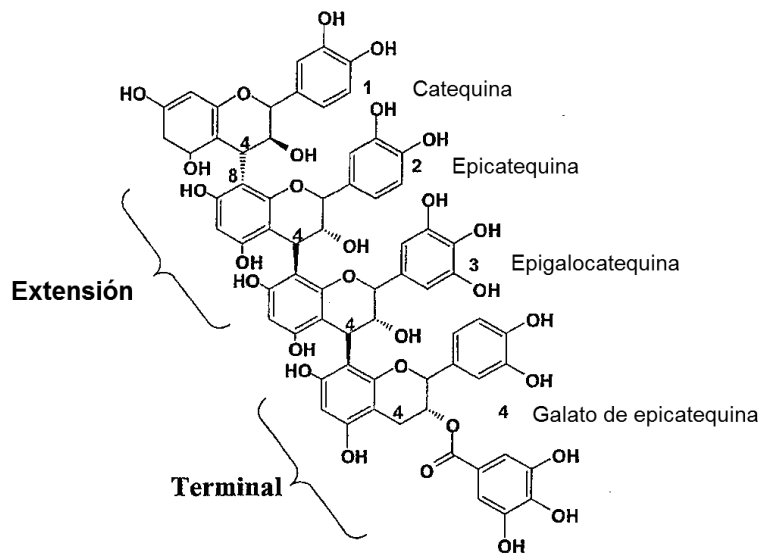
La presente invención se refiere a un nuevo extracto de uva. También se describen procedimientos para producir tal extracto de uva. Este nuevo extracto de uva es útil para, entre otras cosas, reducir la presión arterial en, por ejemplo, los individuos con pre-hipertensión o síndrome metabólico. La presente invención también se refiere a un suplemento dietético que comprende el extracto de uva de la presente invención.

Antecedentes

Las semillas de uva contienen aproximadamente 5 – 8 % en peso de flavonoides. Los flavonoides constituyen un importante grupo de compuestos polifenólicos dietéticos que están ampliamente distribuidos en las plantas. Se han identificado más de 4.000 flavonoides químicamente singulares en fuentes vegetales, tales como frutas, verduras, legumbres, frutos secos, semillas, hierbas, especias, flores, así como en bebidas tales como té, cacao, cerveza, vino y zumo de uva.

La terminología de los flavonoides con respecto a las semillas de uva se refiere a monómeros flavan-3-oles, específicamente (+) – catequina, (-) – epicatequina y 3-galato de (-) – epicatequina. Dos o más monómeros de flavan-3-ol químicamente unidos se denominan proantocianidinas o proantocianidinas oligoméricas ("OPC"), que incluye procianidinas y prodelfinidinas. Las OPC que contienen dos monómeros se denominan dímeros, tres monómeros se denominan trímeros, cuatro monómeros se denominan tetrámeros, cinco monómeros se denominan pentámeros, etc. De forma operativa, los oligómeros tienen cadenas de longitudes de 2 a 7 (dímeros a heptámeros); mientras que los polímeros representan componentes con longitudes de cadenas superiores a 7. Tras un debate considerable, el consenso del Comité de Evaluación del Método de Semillas de Uvas (a través de la Asociación Nacional de Alimentos Nutritivos) fue definir las IPC como todas las proantocianidinas que contienen dos o más monómeros, incluyendo polímeros o taninos condensados. Por lo tanto, oligómeros en extractos de uva incluyen, por ejemplo, dímeros y trímeros, y hay evidencia 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 de epicatequina-galato y unidades terminales. Las unidades de extensión están representadas, por ejemplo, por los grupos de unión de epicatequina (2) y de epigallocatequina. Mientras que, una unidad terminal está representada por el grupo galato de epicatequina (4).



A fin de que los compuestos polifenólicos que se van a usar comercialmente como extracto de uva, estos compuestos tienen que separarse de las uvas en una forma más concentrada. El proceso general en el que se extraen, purifican y concentran compuestos polifenólicos a partir de uvas enteras, residuos de hollejos de uva y semillas de uva se divulga en la Patente de Estados Unidos N° 6.544.581.

Además de las actividades antioxidantes, se ha informado que los flavonoides, en estudios con animales, ejercen efectos anticancerosos reduciendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y que tienen actividades

antiinflamatorias, antimicrobianas y antialérgicas. También se ha encontrado que el extracto de uva de la presente invención se puede utilizar para disminuir la presión arterial en individuos prehipertensos e individuos con síndrome metabólico. También se ha sugerido que el extracto de uva de la presente invención, además de reducir la presión arterial, 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 fuertes indicios de que la LDL modificada de forma oxidativa inicia el desarrollo de este proceso patológico. Por lo tanto, la disminución de la concentración de LDL oxidada puede reducir y / o prevenir la aterosclerosis en individuos con síndrome metabólico.

Los individuos prehipertensos se clasifican en individuos que tienen la presión sistólica entre 120 y 139 mmHg o tienen la presión diastólica entre 81 y 89 mmHg. Esta clasificación se basa en el Séptimo Informe del Comité Nacional Conjunto sobre Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial (JNC 7), página 87, NIH Publicación Nº 04 - 5230. Los individuos prehipertensos no son tratados normalmente con el tratamiento farmacológico, sino que se les proporcionan sugerencias para un estilo de vida saludable. Estas sugerencias incluyen mantener un peso saludable, ser físicamente activo, seguir un plan de alimentación saludable con hincapié en frutas, verduras y alimentos lácteos bajos en grasa, elegir y preparar alimentos con menos sodio y consumir bebidas alcohólicas con moderación en todo caso. La adopción de hábitos de vida saludables suele ser un primer paso eficaz tanto en la prevención como el control de la presión arterial anormal.

El "síndrome metabólico", también denominado "Síndrome X", el "síndrome de resistencia a la insulina" o el "cuarteto mortal", se caracteriza por una acumulación de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular y / o diabetes mellitus de tipo II. El síndrome metabólico puede deberse a una sobreproducción de cortisol, una hormona del estrés, 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 individuos con síndrome metabólico. Los factores de riesgo que caracterizan el síndrome metabólico incluyen una mayor cantidad de tejido adiposo dentro de la cavidad abdominal (obesidad abdominal), resistencia a la insulina con un mayor riesgo de desarrollar diabetes, hiperinsulinemia, niveles elevados de grasas en la sangre, aumento de la presión arterial y niveles elevados de lípidos en suero. El National Cholesterol Education Adult Treatment Panel (ATP III) define el síndrome metabólico como individuos que tienen al menos tres de los siguientes factores de riesgo:

<u>Factor de riesgo</u>	<u>Nivel de definición</u>
Obesidad abdominal, indicada como la circunferencia de la cintura* [†] Varones Mujeres	> 102 cm (> 40 pulgadas) > 88 cm (> 35 pulgadas)
Triglicéridos	≥ 150 mg/dl
HDL colesterol Varones Mujeres	< 40 mg/dl < 50 mg/dl
Presión arterial	≥ 130/≥ 85 mm Hg
Glucosa en ayunas	≥ 110 mg/dl [‡]

*El sobrepeso y la obesidad están asociados con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. La presencia de obesidad abdominal, sin embargo, está más altamente correlacionada con los factores de riesgo metabólico que un índice de masa corporal elevado. Por lo tanto, se recomienda la simple medida de la circunferencia de la cintura para identificar el componente de peso corporal del síndrome metabólico.

†Algunos pacientes varones pueden desarrollar múltiples factores de riesgo metabólico cuando la circunferencia de la cintura aumenta sólo ligeramente, por ejemplo, 94 a 102 cm (37 a 39 pulgadas). Estos pacientes pueden tener una fuerte contribución genética a la resistencia a la insulina. Deberían beneficiarse de los cambios en los hábitos de vida, al igual que los varones con aumentos categóricos de circunferencia de la cintura.

‡Recientemente, la Asociación Americana de la Diabetes ha establecido un punto de corte ≥ 100 mg/dl, por encima del cual los individuos tienen prediabetes (alteración de la glucosa en ayunas) o diabetes. Este nuevo punto de corte debe ser aplicable a la identificación del límite inferior para definir una glucosa elevada como un criterio para el síndrome metabólico.

Entre las afecciones relacionadas con el síndrome metabólico se incluyen diabetes mellitus de tipo II, dislipoproteinemia, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular 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 grasa intraabdominal, niveles elevados de lípidos y glucosa en suero, presión diastólica elevada y / o sistólica elevada e hipertensión.

Existe la necesidad de un extracto de uva y un suplemento dietético que comprenda dicho extracto de uva que se pueda utilizar como terapia adyuvante, que sea eficaz para proporcionar beneficios para la salud tales como disminución de la presión arterial en individuos prehipertensos o en aquellos con síndrome metabólico.

Breve descripción de las figuras

5 La Figura 1 muestra la relación entre la presión arterial basal y la disminución de la presión sistólica para el individuo con síndrome metabólico en tratamiento con el extracto de uva de la presente invención.

La Figura 2 muestra la relación entre la presión arterial basal y la disminución de la presión diastólica para el individuo con síndrome metabólico en tratamiento con el extracto de uva de la presente invención.

10 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 utilizado 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 a los que se han administrado 300 mg de extracto de uva utilizado en la presente invención.

Descripción detallada

15 La presente invención proporciona un extracto de uva que es eficaz en el tratamiento de prehipertensión y síndrome metabólico y / o las afecciones que comprenden el síndrome metabólico.

En una realización, la invención proporciona un extracto de polifenol purificado a partir de uvas producido de acuerdo con el Procedimiento A o el Procedimiento B, en el que el Procedimiento A comprende:

20 (1) poner en contacto un miembro seleccionado del grupo que consiste en uvas enteras, semillas de uvas, residuos de hollejos de uva y mezclas de los mismos con agua a una temperatura elevada para obtener un extracto bruto de uva-agua; y (2) tratar el extracto bruto de uva-agua con un cultivo vivo seleccionado del grupo que consiste en levaduras, bacterias, hongos y mezclas de los mismos a una temperatura elevada para obtener el extracto de polifenol purificado, en el que el Procedimiento B comprende:

25 (1) poner en contacto un miembro seleccionado del grupo que consiste en uvas enteras, semillas de uvas, residuos de hollejos de uva y mezclas de los mismos con agua a una temperatura elevada para obtener un extracto bruto de uva-agua; y (2) tratar el extracto bruto de uva-agua con una enzima tanasa a una temperatura elevada para obtener el extracto de polifenol purificado,

en el que el extracto comprende 2 % en peso o menos de unidades terminales de epicatequina-galato y 12 % en peso o menos de unidades de extensión de epicatequina-galato.

30 En otra realización, la invención proporciona un extracto de polifenoles purificado de la uva, en el que el extracto comprende 2 % en peso o menos de unidades terminales de epicatequina-galato, 12 % en peso o menos de unidades de extensión de epicatequina-galato y el 5 – 15 % de monómeros, 5 – 20 % de dímeros, a 3 – 10 % de trímeros, 2 – 10 % de tetrámeros y 2 – 10 % en peso de pentámeros.

35 En general, el extracto de uva de la presente invención comprende 5 - 15 % de monómeros, 5 - 20 % de dímeros, 3 - 10 % de trímeros, 2 - 10 % de tetrámeros y 2 - 10 % de pentámeros en peso. La cantidad total de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, incluyendo monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros está entre 25 y 50% en peso, preferentemente entre 25 y 40 % en peso, más preferentemente entre 30 y 40 % en peso, y más preferentemente entre 25 y 35 % en peso. La cantidad total de compuestos fenólicos es el 80 % en peso o más, y preferentemente 90 % en peso o más.

40 En una realización, el extracto de uva de la presente invención comprende el 6 – 15 % de monómeros, 7 – 15 % de monómeros, 8 – 15 % de monómeros, 9 – 15 % de monómeros, 10 – 15 % de monómeros, 11 – 15 % de monómeros, 12 – 15 % de monómeros, 13 - 15 % de monómeros, y 14 – 15 % de monómeros. En otra realización, el extracto de uva de la presente invención comprende el 5 – 14 % de monómeros, 5 – 13 % de monómeros, 5 – 12 % de monómeros, 5 – 11 % de monómeros, 5 – 10 % de monómeros, 5 – 9 % de monómeros, 5 – 8 % de monómeros, 5 - 7 % de monómeros, y 5 – 6 % de monómeros. En otra realización más, la cantidad de monómero en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 % y 15 %.

45 En una realización el extracto de uva de la presente invención comprende aproximadamente 6 - 20 % de dímeros, 7 - 20 % de dímeros, 8 - 20 % de dímeros, 9 - 20 % de dímeros, 10 - 20 % de dímeros, 11 - 20 % de dímeros, 12 - 20 % de dímeros, 13 - 20 % de dímeros, 14 - 20 % de dímeros, 15 - 20 % de dímeros, 16 - 20 % de dímeros, 17 - 20 % de dímeros, 18 - 20 % de dímeros y 19 - 20 % de dímeros. En otra realización el extracto de uva de la presente invención comprende 5 - 19 % de dímeros, 5 - 18 % de dímeros, 5 - 17 % de dímeros, 5 - 16 % de dímeros, 5 - 15 % de dímeros, 5 - 14 % de dímeros, 5 - 13 % de dímeros, 5 - 12 % de dímeros, 5 - 11 % de dímeros, 5 - 10 % de dímeros, 5 - 9 % de dímeros, 5 - 8 % de dímeros, 5 - 7 % de dímeros y 5 - 6 % de dímeros. En otra realización más, la cantidad de dímero en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % y 20 %.

En una realización, el extracto de uvas de la presente invención comprende 4 - 10 % de trímeros, 5 - 10 % de trímeros, 6 - 10 % de trímeros, 7 - 10 % de trímeros, 8 - 10 % de trímeros y 9 - 10 % de trímeros. En otra realización, el extracto de uvas de la presente invención comprende 3 - 9 % de trímeros, 3 - 8 % de trímeros, 3 - 7 % de trímeros, 3 - 6 % de trímeros, 3 - 5 % de trímeros y 3 - 4 % de trímeros. En otra realización más, la cantidad de trímero en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % y 10 %.

En una realización, el extracto de uvas de la presente invención comprende 3 - 10 % de tetrámeros, 4 - 10 % de tetrámeros, 5 - 10 % de tetrámeros, 6 - 10 % de tetrámeros, 7 - 10 % de tetrámeros, 8 - 10 % de tetrámeros y 9 - 10 % de tetrámeros. En otra realización, el extracto de uvas de la presente invención comprende 2 - 9 % de tetrámeros, 2 - 8 % de tetrámeros, 2 - 7 % de tetrámeros, 2 - 6 % de tetrámeros, 2 - 5 % de tetrámeros, 2 - 4 % de tetrámeros y 2 - 3 % de tetrámeros. En otra realización más, la cantidad de tetrámero en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % y 10 %.

En una realización, el extracto de uvas de la presente invención comprende 3 - 10 % de pentámeros, 4 - 10 % de pentámeros, 5 - 10 % de pentámeros, aproximadamente 6 - 10 % de pentámeros, 7 - 10 % de pentámeros, 8 - 10 % de pentámeros, and 9 - 10 % de pentámeros. En otra realización, el extracto de uvas de la presente invención comprende 2 - 9 % de pentámeros, 2 - 8 % de pentámeros, 2 - 7 % de pentámeros, 2 - 6 % de pentámeros, 2 - 5 % de pentámeros, 2 - 4 % de pentámeros y 2 - 3 % de pentámeros. En otra realización más, la cantidad de pentámero en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % y 10 %.

En una realización, la cantidad total de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, es decir, monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros, es 25 % o mayor, 30 % o mayor, 35 % o mayor, 40 % o mayor, 45 % o mayor hasta 50 % en peso. En otra realización, la cantidad total de compuestos fenólicos de bajo peso molecular es 25 % o mayor, 26 % o mayor, 27 % o mayor, 28 % o mayor, 29 % o mayor, 30 % o mayor, 31 % o mayor, 32 % o mayor, 33 % o mayor, 34 % o mayor, 35 % o mayor, 36 % o mayor, 37 % o mayor, 38 % o mayor, 39 % o mayor, 40 % o mayor, 41 % o mayor, 42 % o mayor, 43 % o mayor, 44 % o mayor, 45 % o mayor, 46 % o mayor, 47 % o mayor, 48 % o mayor, 49 % o mayor hasta 50 % en peso.

El extracto de uva de la presente invención tiene un perfil fenólico, tal como se determina por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase normal ("HPLC"), de 5 - 15 % de monómeros, a 5 - 20 % de dímeros, 4 - 10 % de trímeros, 2 - 10 % de tetrámeros y 2 - 10 % de pentámeros, en peso. El extracto de uva de la presente invención también comprende 80 % en peso o más de compuestos fenólicos totales y, preferentemente, 90 % en peso o más, determinado mediante el método de Folin Ciocalteu. El extracto de uva de la presente invención también comprende 2 % en peso o menos de unidades terminales de epicatequina-galato, más preferentemente 1 % en peso o menos, determinado mediante HPLC de fase inversa después de la reacción de tiolisis. El extracto de uva de la presente invención también comprende 12 % en peso o menos de unidades de extensión de epicatequina-galato, preferentemente 8 % en peso o menos y, más preferentemente, 5 % en peso o menos, determinado mediante HPLC de fase inversa después de la reacción de tiolisis.

El extracto de uva de la presente invención se produce mediante la modificación del proceso de extracción en agua caliente divulgado en la Patente de Estados Unidos N° 6.544.581 (Patente '581) como se describe a continuación. En general, el proceso de extracción en agua caliente, como se divulga en la patente '581, implica las siguientes etapas. En la etapa (1), las semillas de uva, secas o frescas, se pueden calentar con agua caliente durante un tiempo suficiente para extraer la mayor parte de los polifenoles. Pueden usarse temperaturas de 60 - 100 °C (140 - 212 °F), preferentemente 71 - 100 °C (160 - 212 °F), más preferentemente 82 - 100 °C (180 a 212 °F), aún más preferentemente 88 a 100 °C (190 a 212 °F), durante un período de aproximadamente 1 - 6 horas. El tiempo de calentamiento puede variarse en relación con la temperatura utilizada. Generalmente, las temperaturas menores requieren tiempos de extracción más largos. En la etapa (2), el extracto bruto de semilla de uva-agua se puede separar a partir de las semillas drenando través de tamices metálicos. Después, el extracto se puede enfriar y tratar con una enzima pectolítica adecuada disponible comercialmente, tal como Pectinex® Ultra SP-L fabricado por Novo Nordisk, a una concentración de aproximadamente 50 - 200 ppm para degradar los constituyentes de la pared celular. Preferentemente, el extracto de agua - semillas se puede tratar con enzimas durante un periodo de dos horas a una temperatura de 27 - 48 °C (80 - 120 °F). Como alternativa, extracto de agua - semillas puede tratar con enzimas durante 7 - 14 días o más a aproximadamente 4 - 10 °C (40 - 50 °F). En la etapa (3), el extracto de semilla turbio resultante se puede acidificar con un ácido, preferentemente un ácido mineral, más preferentemente con ácido sulfúrico, hasta un pH de aproximadamente 1,5 - 2,5 y se deja reaccionar desde aproximadamente una hora a aproximadamente dos días. El extracto acidificado se puede enfriar durante hasta varias semanas para permitir que las macromoléculas, incluidas proteínas y otros polisacáridos, sedimenten. A continuación, el extracto acidificado enfriado se puede filtrar utilizando tierra de diatomeas para producir un extracto de semilla clarificado. También se pueden usar otros coadyuvantes de filtración, tales como perlita.

La etapa (2) de la patente '581 puede modificarse mediante el tratamiento enzimático del extracto de semilla-agua durante un periodo de cuatro a cinco días a una temperatura de aproximadamente 27 - 48 °C (80 a 120 °F) con el fin de producir el extracto de uva de la presente invención. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la duración más larga que la usada en la patente '581 en el intervalo de temperatura especificado de esta etapa representa el nuevo extracto de uva resultante. El tiempo del tratamiento enzimático puede variarse en relación con la temperatura usada. Generalmente, temperaturas menores requieren tiempos de extracción más largos. Por lo

tanto, el extracto de semilla - agua puede tratarse enzimáticamente durante hasta dos semanas o más a temperaturas de aproximadamente 15 – 27 °C (60 a 80 °F).

En una realización, el extracto de uva de la presente invención se puede producir mediante las siguientes etapas. Después de la extracción de la etapa (1) o después del tratamiento con pectinasa en la etapa (2) de la patente '581, el extracto puede frotarse sobre una placa de agar bacteriológico. Tras la incubación, las especies plurales de levaduras, bacterias y/u hongos pueden estar presentes dependiendo del material de partida. El cultivo vivo puede aislarse en forma de un cóctel. Una vez aislado, el cóctel se puede usar en las posteriores etapas de extracción y/ tratamiento enzimático con pectinasa. Por ejemplo, un extracto de semilla-agua puede tratarse con enzimas con cualquier enzima pectolítica adecuada disponible comercialmente y combinarse con el cóctel aislado de levaduras, bacterias y/u hongos. La mezcla combinada se puede dejar reposar durante un periodo de aproximadamente uno a diez días, preferentemente de aproximadamente dos a cinco días, a una temperatura de aproximadamente 70 - 100 °F. El tiempo de tratamiento enzimático puede variar en relación con la temperatura usada y el recuento del inóculo. El extracto de semilla turbio resultante se puede acidificar con un ácido adecuado como se ha tratado anteriormente hasta un pH de 1,5 - 2,5 y se deja reaccionar durante de aproximadamente una hora a aproximadamente dos días. El extracto acidificado se puede enfriar y almacenar durante varios días para permitir la floculación de proteínas y polisacáridos. El extracto acidificado frío se puede filtrar después usando tierra de diatomeas para dar un extracto de semilla clarificado que se puede procesar adicionalmente de acuerdo con la patente '581 para producir un extracto de uva purificado adecuado para reducir la presión arterial y reducir la LDL oxidada.

La cantidad de ácido gálico en los extractos de uva producidos mediante el procedimiento de '581 en comparación con los extractos de uva producidos mediante el presente procedimiento que implica un cóctel de levaduras, bacterias y/u hongos se analizó mediante HPLC. Dicho análisis mostró un incremento con respecto a un valor de entre aproximadamente 50 y 150 ppm de ácido gálico en los extractos de uvas del proceso de '581 hasta un valor de entre aproximadamente 400 y 1500 ppm de ácido gálico en los extractos de uvas de la presente invención usando el cóctel. El incremento en ácido gálico indica que las unidades terminales y de extensión de epicatequina-galato se desesterifican de las procianidinas. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que el cóctel de levaduras, bacterias y/u hongos usa el extracto de uvas como sustrato para el crecimiento y producen actividad enzimática de tanasa, lo que tiene como resultado la desesterificación de las procianidinas y la liberación de ácido gálico. Como tal, el uso de un cóctel de levaduras, bacterias y / u hongos vivos produce el extracto de uva de la presente invención que tiene 2 % en peso o menos de unidades terminales de epicatequina-galato, más preferentemente 1 % en peso o menos, y 12 % en peso o menos de unidades de extensión de epicatequina-galato, preferentemente 8 % en peso o menos, y más preferentemente 5 % en peso o menos.

En una realización, el extracto de uva de la presente invención se puede producir mediante las siguientes etapas. Después de la extracción de la etapa (1) o después del tratamiento con pectinasa en la etapa (2) de la patente '581, cualquier enzima tanasa comercial adecuada, por ejemplo, una enzima tanasa fúngica tal como la tanino acilhidrolasa, E.C3.1.1.20, se puede añadir a una concentración de entre aproximadamente 5 y 1.000 ppm. Dependiendo de la concentración de la enzima tanasa utilizada, la mezcla se puede hacer reaccionar durante aproximadamente una hora a aproximadamente dos días, preferentemente uno o dos días, o hasta que las unidades terminales se reducen a 2 % o menos, preferentemente 1 % o menos, y las unidades de extensión se reducen a 8 % o menos, preferentemente 5 % o menos. Después de un tiempo de reacción suficiente, el extracto puede acidificarse hasta un pH de 1,5 a 2,5, lo que permite la floculación de proteínas y polisacáridos durante el almacenamiento en refrigeración de 4 a 15 °C (40 a 60 °F). El extracto puede filtrarse para aclarar y procesarse adicionalmente de acuerdo con la patente '581 para producir un extracto de uva con características para la reducción de la presión arterial.

El extracto de uva de la presente invención puede formularse en suplementos dietéticos, incluyendo cápsulas, comprimidos, polvos, soluciones, geles, suspensiones, cremas, pastas, geles, supositorios, parches transdérmicos, y similares. Estos suplementos dietéticos en forma de, por ejemplo, polvo o solución, pueden añadirse a nutracéuticos, alimentos y / o bebidas para formar productos nutracéuticos, alimentos, y / o bebidas funcionales. Los suplementos dietéticos pueden formularse como polvos, por ejemplo, para mezclar con líquidos consumibles, tales como leche, zumo, agua o geles consumibles o jarabes para mezclar en otros líquidos o alimentos dietéticos. Los suplementos dietéticos de la presente invención pueden formularse con otros alimentos o líquidos para proporcionar alimentos suplementarios previamente medidos, como las barras de servicio individuales. Los productos alimentarios típicos que pueden incorporar el extracto de uva de la presente invención incluyen alimentos lácteos, tales como yogur, cereales, pan, productos alimenticios de aperitivos, zumos de frutas y otras bebidas no alcohólicas. Según sea necesario se pueden añadir aromas, aglutinantes, proteínas, hidratos de carbono complejos, vitaminas, minerales y similares. Preferentemente, el extracto de uva se formula para administración oral.

La presente invención también proporciona un suplemento dietético que comprende el extracto de uva de la invención. El suplemento dietético cuando se administra a un mamífero, incluyendo seres humanos, reduce la presión arterial en individuos con, por ejemplo, prehipertensión o síndrome metabólico. Un curso con éxito de tratamiento de, por ejemplo, los individuos con prehipertensión o síndrome metabólico o de prevención de afecciones de estas enfermedades se caracteriza, entre otras cosas, por la reducción de una o ambas de la presión arterial sistólica y / o diastólica en al menos aproximadamente un 2 %, preferentemente en al menos aproximadamente un 5 %, y más preferentemente en al menos aproximadamente un 8 %, sin producir nada o muy

poco incremento o de la resistencia a la insulina.

Los suplementos dietéticos de 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 a tratar y la vía de administración. La dosis, y quizá la frecuencia de la dosis, también variarán de acuerdo con la edad, el peso corporal y la respuesta del individuo. En general, el intervalo de dosis diaria total, para las afecciones descritas en el presente documento, es de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1.000 mg de extracto de uva administrados en dosis únicas o divididas por vía oral, tópica, o transdérmica, preferentemente por vía oral. Un intervalo de dosis diaria oral preferida es de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg del extracto de uva (es decir, excluyendo los excipientes y los vehículos), más preferentemente de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 300 mg. Por ejemplo, las cápsulas o comprimidos pueden formularse a dosis de 150 mg o 300 mg, mientras que las bebidas se pueden formular con 50 mg de extracto de uva de la presente invención. Tal régimen de administración se mantiene preferentemente durante al menos un mes, más preferentemente seis meses o más.

Los suplementos dietéticos de la presente invención pueden formularse de una manera convencional (es decir, mediante mezclado en seco, granulación en seco o en húmedo, compresión directa), en mezcla con vehículos, excipientes, vitaminas, minerales y / u otros nutrientes farmacéuticamente aceptables. Entre los vehículos y excipientes representativos se incluyen, entre otros, almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes, y similares, en el caso de preparaciones sólidas orales (tales como polvos, cápsulas, y comprimidos).

Cualquier vía de administración adecuada puede emplearse para administrar los suplementos 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 usar cualquier vía de administración adecuada para proporcionar al paciente una cantidad eficaz del extracto de uva de la presente invención, se prefiere la administración oral, incluidas las formas de dosificación sólidas tales como comprimidos, cápsulas, o polvos. También se prefiere que el extracto de uva se formule para su uso en productos nutracéuticos, alimentos o bebidas funcionales.

El extracto de uva de la presente invención también se puede combinar con otros agentes activos incluyendo, entre otros, diuréticos, beta bloqueantes, inhibidores de la ECA, antagonistas de la angiotensina, bloqueantes de los canales de calcio, alfa bloqueantes, alfa-beta-bloqueantes, inhibidores del sistema nervioso, vasodilatadores, antioxidantes.

1. Caracterización de los extractos de uva

Recientemente, se ha notificado que el uso de polifenoles de semilla de uva no reduce la presión arterial sistólica y en realidad aumenta la presión arterial 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. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que el perfil fenólico de extractos de uva es importante para su eficacia en la reducción de la presión arterial. El extracto de uva evaluado en el estudio de Ward fue Vinlife®, que tiene un perfil fenólico del total de los compuestos fenólicos 50,6%, determinado mediante el método de Folin Ciocalteu, 11,2 % de unidades terminales de epicatequina-galato y 11,8 % de unidades de extensión de epicatequina-galato, determinado mediante HPLC de fase inversa después de la reacción de tiolisis y 7,3 % de monómeros, 4,4 % de dímeros, 2,0 % de trímeros, 1,9 % de tetrameros y 1,1 % de pentámeros, con un total cantidad de monómeros, dímeros, trímeros y pentámeros de 16,7 %, según lo determinado por HPLC de fase normal.

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

1. Alto grado de pureza tal como se determina por tener una cantidad del compuesto fenólico total mayor que aproximadamente 80 % en peso, y más preferentemente mayor que aproximadamente 90 % en peso, como se determina mediante el método de Folin Ciocalteu;
2. Alta cantidad, por ejemplo, entre aproximadamente 25 y 50 % en peso de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, en el que los compuestos fenólicos de bajo peso molecular son monómeros, dímeros, trímeros, tetrameros, y pentámeros; y,
3. Poca o ninguna cantidad, por ejemplo, menos de 2 %, preferentemente menos de 1 %, de epicatequina-galato en las unidades terminales y una cantidad pequeña, por ejemplo, menos de 12 %, preferentemente menos de 5 %, de epicatequina-galato en las unidades de extensión.

De nuevo, aunque sin pretender quedar ligado 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 el síndrome metabólico. En

particular, se cree que la ausencia de epicatequina-galato en las unidades terminales y la pequeña cantidad de epicatequina-galato en las unidades de extensión del presente extracto de uva junto con la presencia de una mayor cantidad de compuestos de bajo peso molecular es responsable del aumento de la vasodilatación, que se cree que es responsable de la disminución de la presión arterial en los estudios clínicos de los individuos con síndrome metabólico y prehipertensión descritos a continuación.

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

El análisis mediante HPLC de fase inversa del extracto de uva se puede utilizar para determinar la proporción de monómeros, oligómeros y polímeros en función del área del pico a 280 nm.

Condiciones de la HPLC:

Fase móvil:	A: 2 % de ácido acético glacial			
	B: 80 % de acetonitrilo, 0,4 % de ácido acético			
Gradiente:	Tiempo			
	(min)	% de A	% de 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 × 4,6 mm, Prodigy 5μ ODS (3) 100Å			
	(Phenomenex, Torrance, CA)			
Caudal:	1,0 ml/min			
Longitud de onda de detección:	280 nm			
Temperatura:	30 °C			
Inyección:	25 μl			

Preparación de la muestra. Pesar con precisión 0,1 g de extracto de uva en un matraz aforado de 100 ml. Disolver la muestra en una cantidad pequeña de metanol (≤ 5 ml), sonicar en caso necesario. Llenar hasta completar el volumen con agua 18 Megaohm. Centrifugar la muestra (14.000 rpm, 10 minutos) o filtrar 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 del pico y la concentración de los patrones.

Procedimiento para determinar las unidades terminales y de extensión de proantocianidinas en base al análisis de HPLC tras la reacción de tiolisis

La tiolisis es un método para determinar el tamaño molecular promedio (grado de polimerización) y la estructura básica de las proantocianidinas en el extracto de uva. La información proporcionada puede indicar la calidad biológica del extracto de uva para la absorción nutricional en el cuerpo.

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

Condiciones: 0,1 % de la solución de metanol del extracto de uva se mezcló con un volumen igual de reactivo de tiolisis, se agitó y se calentó a 90 °C durante 2 minutos. Se añadió agua para detener la reacción. Después se centrifugó el reactante a 14.000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se analizó directamente mediante HPLC.

Condiciones de la HPLC:

Fase móvil:	A: 10 % de ácido acético /0,1 % de TFA/5 % de acetonitrilo/84,9 % de agua (v/v/v/v) B: acetonitrilo
Gradiente:	0 - 30 min 0 - 50 % de B 30 - 35 min 50 - 100 % de B
Columna:	150 cm × 2,0 mm i.d., 4 µm Synergi hydro-RP 80 A (Phenomenex, Torrance, CA)
Caudal:	0,3 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

Los extractos de uva a analizar se disolvieron en metanol, se mezclaron con un volumen igual de reactivo tiolítico y se calentaron durante 2 minutos a 90 °C. Las unidades liberados se identificaron mediante espectrometría de masas y se determinaron cuantitativamente mediante HPLC en las condiciones anteriores. El grado de polimerización promedio se midió mediante el cálculo de la relación molar de todas las unidades de flavan-3-ol (aductos de tioéter más unidades terminales) con respecto a catequina, epicatequina y galato de epicatequina correspondiente a las unidades terminales. El porcentaje de unidades terminales de galato de epicatequina se determinó en base a la proporción molar de 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 de galato de epicatequina se determinó en base a la proporción molar de los aductos de tioéter de galato de epicatequina en la suma de moles totales de los aductos de tioéter de las unidades de extensión, que incluyen aductos de tioéter de catequina, epicatequina y galato de epicatequina. La cantidad total de compuestos fenólicos se cuantificó en términos de gramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) mediante el método Folin Ciocalteu. Para más detalles sobre el procedimiento de análisis de Folin Ciocalteu, consulte: 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, or 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.

TABLA 1: Características comparativas de MegaNatural®-BP y otros extractos de uva en el mercado determinado por HPLC de fase inversa

Origen	Nombre del producto	Fenol total	Galato de epicatequina	Galato de epicatequina	Determinado mediante HPLC de fase inversa usando el área del pico		
		g de GAE/100 g (como tal)	Terminal (%)	Extensión (%)	Monómeros (%)	Oligómeros (%)	Polímeros (%)
EE.UU.	MegaNatural®-BP	93,8	0,0	6,8	12,8	62,6	24,6
EE.UU.	MegaNatural®-BP	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

(continuación)

Origen	Nombre del producto	Fenol total	Galato de epicatequina	Galato de epicatequina	Determinado mediante HPLC de fase inversa usando el área del pico		
		g de GAE/100 g (como tal)	Terminal (%)	Extensión (%)	Monómeros (%)	Oligómeros (%)	Polímeros (%)
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
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 protoancianidinas mediante HPLC de fase normal

- 5 *Análisis de las protoancianidinas mediante HPLC:* Los análisis cromatográficos se realizaron en una HPLC serie HP 1100 equipada con un automuestreador / inyector, bomba binaria, calentador de columna, detector de matriz de diodos, detector de fluorescencia y HP ChemStation para la recopilación y la manipulación de datos. Las separaciones de fase normal de los oligómeros de proantocianidina se realizaron en una columna a Phenomenex Luna Silica (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 lineal 0 - 17,6 % de B
30 - 45 min lineal 17,6 - 30,7 % de B
45 - 50 min lineal 30,7 - 87,8 % de B
50 - 60 min lineal 87,8 % de B

(continuación)

Columna: Phenomenex LUNA Silica (3,0 x 150 mm; 3,0 µm)
 Caudal: 0,5 ml/min
 Detección: HP 1100 FLD con excitación a 276 nm y emisión a 316 nm
 Temperatura: 25 °C
 Inyección: 3 µl

En todos los casos, la columna se volvió a equilibrar 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 dímeros, trímeros, tetrameros y pentámeros a monómeros con detección de fluorescencia fueron notificados por R. L. Prior and L. Gu, "Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in American diet," *Phytochemistry* 2005, 66(18) 2264 - 2280, usando patrones aislados y purificados de granos de cacao. Estos factores de respuesta se usaron para calcular los dímeros, trímeros, tetrameros y pentámeros con respecto a los monómeros.

10 TABLA 2: Características comparativas de MegaNatural®-BP y otros extractos de uva en el mercado determinado por HPLC de fase normal

Origen	Nombre del producto	Determinado mediante HPLC de fase normal usando equivalente de catequina y epicatequina (% en peso)						
		Monómeros	Dímeros	Trímeros	Tetrameros	Pentámeros	Monómeros: 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 como se exponen en las Tablas 1 y 2 se obtuvieron utilizando diferentes métodos, que representan los diferentes intervalos de, por ejemplo, el porcentaje de monómeros. Por ejemplo, se utilizó HPLC de fase inversa

para determinar el porcentaje de monómeros, oligómeros y polímeros en base a las áreas de los picos de estos tres grupos de compuestos. El ácido galaico se incluye como monómeros. En la HPLC de fase normal, se usaron catequina y epicatequina como patrones para determinar la cantidad de monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros en el extracto de uva en peso. Los factores de respuesta relativos de los dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros relacionados con los monómeros notificados por R. L. Prior y L. Gu se usaron para calcular los dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros.2. Efecto del extracto de uva sobre la presión arterial de individuos con síndrome metabólico

Los efectos del extracto de uva de la presente invención sobre la presión arterial se estudiaron en veinticuatro individuos diagnosticados con síndrome metabólico. El estudio incluyó a un número igual de varones y mujeres de edades comprendidas entre los 20 y los 50 años El síndrome metabólico se diagnosticó en base a los criterios definidos por el Programa National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III. Cada sujeto exhibió al menos tres de las siguientes características: 1) Glucemia en ayunas > 110 mg/dl, 2) HDL (< 40 mg/dl en varones y < 45 mg/dl en mujeres), 3) presión arterial > 130/85, y 4) obesidad abdominal (> 102 cm para varones y > 88 cm para mujeres). Se excluyó a los individuos que eran fumadores actuales o exfumadores (< 3 años); tomar medicamentos antiinflamatorios o hipertensos; o que habían consumido compuestos antioxidantes de libre dispensación.

Los individuos fueron de aleatorizados en bloque a tres grupos de ocho y se les dio una de las siguientes cápsulas en función de su asignación por grupo.

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 cápsulas suficientes para tomar la misma dosis una vez al día durante los próximos veinticinco ocho días. Al final de este periodo, se obtuvieron las mediciones de la presión arterial. Las presiones arteriales ambulatorias se registraron durante un periodo de 12 horas al inicio del estudio y otra vez después de cuatro semanas. El procedimiento era no invasivo e implicó la colocación de un manguito de presión arterial en la parte superior del brazo. El manguito se conectó a un dispositivo de inflado automático aprobado por la FDA que llevaba una cinta.

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

Tabla 3: Resultados del extracto de uva de la presente invención sobre la presión arterial del individuo 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	ns	ns

*p es la probabilidad de que los valores de inicio y final sean los mismos. Una p de 0,05 o menos (5 %) generalmente se considera significativa.

La relación entre la presión arterial basal y la disminución las presiones sistólica y diastólica se muestran en las FIG.1 y 2. La presión arterial se expresa en mmHg. Dado que el diagnóstico de síndrome metabólico se basa en la presencia de tres de los factores de riesgo mencionados (uno de los cuales es la presión arterial), el estudio no aleatorizó en bloque a los individuos para la presión arterial. Como tales, las presiones promedios en los tres grupos no fueron similares (pero variaron dentro de un estrecho intervalo).

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

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

Los efectos del extracto de uva de la presente invención sobre la LDL oxidada se estudiaron en los mismos veinticuatro individuos diagnosticados con síndrome metabólico como se ha tratado anteriormente. La concentración de LDL oxidada se midió al comienzo del estudio y de nuevo después de cuatro semanas de tratamiento. Con el fin de medir la concentración de LDL oxidada, se tomó una muestra de sangre de cada individuo y se analizó.

Los cambios en la concentración de LDL oxidada para los tres grupos se resumen en la Figura 3. La Figura 3 muestra un ligero descenso en el colesterol LDL oxidado para el placebo, una caída de tendencia en la LDL oxidada para los individuos que tomaban 150 mg de extracto de uva de la presente invención y un descenso estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en las LDL oxidadas para los individuos que toman 300 mg del extracto de uva de la presente invención. La Figura 4 representa la relación entre el cambio en la concentración de LDL oxidada y la concentración basal de LDL oxidada en individuos a los que se han administrado 300 mg de extracto de uva utilizado en el estudio. El coeficiente de regresión, R^2 , = 0,52. La figura 4 muestra una mayor caída de la concentración de LDL oxidada en individuos que comenzaron con 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 el plasma de individuos con síndrome metabólico. Además, hubo una disminución estadísticamente significativa de la concentración de LDL oxidada para aquellos individuos a los que se administraron 300 mg del extracto de uva de la presente invención.

4. Efecto del extracto de uva sobre individuos con prehipertensión

Los efectos del extracto de uva de la presente invención se estudiaron en veinticuatro individuos diagnosticados con prehipertensión. El estudio incluyó a un número igual de varones y mujeres de edades comprendidas entre los 30 y los 60 años. La prehipertensión se diagnosticó sobre la base de los criterios definidos por el Séptimo Informe del Comité Nacional Conjunto sobre Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial. Cada sujeto tenía la presión sistólica entre 120 y 139 mmHg y / o la presión diastólica entre 81 y 89 mmHg. Se excluyó a los individuos que eran fumadores actuales o exfumadores (< 3 años); tomar medicamentos antiinflamatorios o hipertensos; o que habían consumido compuestos antioxidantes de libre dispensación.

Los individuos fueron aleatorizados en bloque por sexo en dos grupos de doce y se les dio una de las siguientes cápsulas en función de su asignación por grupo.

El grupo 1 recibió una cápsula de placebo

El grupo 2 recibió una cápsula que contenía 300 mg de MegaNatural®-BP

Los individuos recibieron cápsulas suficientes para tomar la misma dosis una vez al día durante las próximas ocho semanas. Al final de este período, se obtuvieron las mediciones de la presión arterial. Las presiones arteriales ambulatorias se registraron durante un período de 12 horas al inicio del estudio y otra vez después de ocho semanas. El procedimiento era no invasivo e implicó la colocación de un manguito de presión arterial en la parte superior del brazo. El manguito se conectó a un dispositivo de inflado automático aprobado por la FDA que llevaba una cinta.

La Tabla 4 muestra los datos de la presión arterial 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 de la presente invención se produjeron reducciones significativas tanto en la presión sistólica como diastólica; sin embargo, no hubo cambios significativos en el grupo que recibió placebo. Por ejemplo, el descenso medio de la presión arterial sistólica en el grupo tratado con MegaNatural®-BP fue $7,2 \pm 2,5$ mmHg, mientras que la presión arterial sistólica en el grupo de placebo aumentó en $0,03 \pm 1,5$ mmHg. Los datos se resumen a continuación. Los valores se expresan en mmHg (media $\pm$ SEM).

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

	300 mg de MegaNatural®-BP a diario		Placebo	
	Sistólica	Diastólica	Sistólica	Diastólica
Inicio	133 ± 2	80 ± 2	134 ± 2	79 ± 2
8 semanas	126 ± 2	73 ± 2	134 ± 2	80 ± 2
p*	0,021	0,042	ns	ns

*p es la probabilidad de que los valores de inicio y final sean los mismos. Una p de 0,05 o menos (5 %) generalmente se considera significativa.

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

5 Ejemplos

La invención se define adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos que describen un procedimiento para fabricar el extracto de uva y preparar los suplementos dietéticos. Los ejemplos son representativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Procedimiento para fabricar extracto de uva

10 Semillas de uva secas se extrajeron con agua a una temperatura de 93° C (200 °F) durante dos horas y el extracto se separó de las semillas en tamices metálicos. El extracto se enfrió hasta 32-37° C (90 - 100 °F) y se añadió pectinasa a una concentración de 200 ppm. El extracto se dividió 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
15 porción se añadió la tanasa 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 la enzima tanasa, la concentración de ácido gálico se elevó a 904 ppm con 0 % e unidades terminales y aproximadamente 5,5 % de unidades de extensión. Fueron
20 necesarias aproximadamente treinta y cuatro horas de tratamiento con 50 ppm de la enzima tanasa para que el ácido gálico alcanzara 810 ppm con menos del 1 % de unidades terminales y menos del 6 % de unidades de extensión. Después de aproximadamente dos días, ambos extractos se acidificaron hasta un pH de 1,5 a 2,5, lo que permitió la floculación de proteínas y polisacáridos durante el almacenamiento en refrigeración de 4 a 15 °C (40 a 60 °F). El extracto se filtró y se procesó adicionalmente de acuerdo con la patente '581 para producir un extracto de uva con características para la reducción de la presión arterial y para la reducción de las concentraciones de LDL oxidada.

25 Ejemplo 2: Cápsulas

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

Ejemplo 3: Polvo

El extracto de uva MegaNatural®-BP se formuló en una mezcla seca con los excipientes tal como se muestra 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 combinan 9,47 g de la mezcla seca con 500 ml de agua fría y se agitó. Una porción de 500 ml contiene 16
35 calorías. La bebida final contiene 100 mg de extracto de uva MegaNatural®-BP y 120 mg de vitamina C por 1 l de porción, que tendrá un valor ORAC de 2200 TE.

ORAC, medida en equivalentes en mmoles de Trolox (un derivado del tocoferol hidrosoluble y no comercial), (TE) por gramo significa "Capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno." Esta es la norma por la cual los científicos miden la actividad antioxidante en alimentos y suplementos. Una sola porción de frutas y verduras frescas o recién hechas suministran un promedio de 600 a 800 unidades ORAC. Se ha sugerido que el aumento de la ingesta de alimentos o suplementos que proporcionan de 2.000 a 5.000 unidades ORAC al día puede tener beneficios para la salud.
40

TABLA 4

Ingredientes	% de la mezcla seca (g)
Maltodextrina	37,48
Ácido cítrico	29,99
Agente de enturbiamiento (Purity Gum 2000)*	5,25
Aspartamo	3,85
Citrato sódico, calidad FCC	3,75
Guar ultra**	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

(continuación)

<u>Ingredientes</u>	<u>% de la mezcla seca (g)</u>
Amarillo FD&C nº 5(20:1 en Maltodextrina)	0,75
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: Bebida

- 5 El extracto de uva MegaNatural®-BP se formuló en una bebida con los excipientes como se muestra en la Tabla 5. La siguiente bebida contiene 50 mg de extracto de uva MegaNatural®-BP y 60 mg de vitamina C (100 % IDR) por porción de 236 ml (8 fl oz). En una porción de 236 ml (8 fl oz), la bebida contiene 0 calorías y 0,15 g de carbohidratos totales. Una porción de 473 ml (16 fl oz) tendría un valor ORAC de 2200 TE.

TABLA 5

<u>Ingredientes</u>	<u>% en peso</u>
Agua	99,4373
Ácido cítrico	0,2640
Color morado MegaNatural (Canandaigua Conc.)	0,0528
Sethness - Greenleaf Flavor System	0,0867
Benzoato sódico	0,0448
Sorbato potásico	0,0448
Ácido ascórbico	0,0338
Extracto de uva MegaNatural®-BP (Polyphenolics, Inc.)	0,0211
Aspartamo	<u>0,0147</u>
TOTAL	100,0000 %

10 **Ejemplo 5: Bebida**

- 15 El extracto de uva MegaNatural®-BP se formuló en una bebida con los excipientes como se muestra en la Tabla 6. La siguiente bebida contiene 50 mg de extracto de uva MegaNatural®-BP y 60 mg de vitamina C (100 % IDR) por porción de 236 ml (8 fl oz). En una porción de 236 ml (8 fl oz), la bebida contiene 15 calorías y 4 g de carbohidratos totales. Una porción de 473 ml (16 fl oz) tendría un valor ORAC de 2200 TE.

TABLA 6

<u>Ingredientes</u>	<u>% en peso</u>
Agua	95,8778
Zumo de naranja concentrado 65	1,3973
Zumo de arándanos concentrado 50	0,8691
Color morado MegaNatural (Canandaigua Conc.)	0,5032
Sethness - Greenleaf Flavor System	1,1074
Benzoato sódico	0,0444
Sorbato potásico	0,0444
Ácido ascórbico	0,0357
Extracto de uva MegaNatural®-BP (Polyphenolics, Inc.)	0,0210
Neotamo (The NutraSweet Co.)	0,0997
TOTAL	100,0000 %

Ejemplo 6: Suplemento de vitaminas/minerales

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

5

TABLA 7

<u>Ingredientes</u>	<u>% Valor diario</u>
Vitamina A 3500 UI (29 % como Beta Caroteno)	70
Vitamina C 60 mg	100
Vitamina D 400 UI	100
Vitamina E 45 UI	150
Vitamina K 10 mcg	13
Tiamina 1,5 mg	100
Riboflavina 1,7 mg	100
Niacina 20 mg	100
Vitamina B6 3 mg	150
Ácido fólico 400 mcg	100
Vitamina B12 25 mcg	417
Biotina 30 mcg	10
Ácido pantoténico 10 mg	100
Calcio 299 mg	20
Fósforo 48 mg	5
Yodo 150 mcg	100
Magnesio 100 mg	25
Cinc 15 mg	100
Selenio 20 mg	29
Cobre 2 mg	100
Manganeso 2 mg	100
Cromo 150 mcg	125
Molibdeno 75 mcg	100
Cloruro 72 mg	2
Potasio 80 mg	2
Extracto de uva MegaNatural®-BP 150 mg	*
Boro 150 mcg	*
Níquel 5 mcg	*
Silicona 2 mg	*
Vanadio 10 mcg	*
Luteína 250 mcg	*
Licopeno 300 mcg	*

*Valor diario (%VD) no establecido

Ejemplo 7: Suplemento de vitaminas/minerales

El extracto de uva MegaNatural®-BP (150 mg) se mezcló con los ingredientes y excipientes siguientes citados en la Tabla 8 en el batidor V hasta uniformidad. La mezcla se prensó en comprimidos que alcanzaron un peso específico de $775 \text{ mg} \pm 2 \%$ para formar un suplemento multivitamínico/de minerales. Los comprimidos se recubrieron por pulverización con un recubrimiento transparente de una goma soluble en agua tal como hidroxipropil metilcelulosa y se secaron. La dosis diaria es de un comprimido al día. El tamaño del lote para la formulación de la Tabla 8 es 500.000 comprimidos.

10

TABLA 8

<u>Ingredientes (unidades de medida)</u>	<u>Indicación de la etiqueta</u>	<u>Exceso (%)*</u>	<u>Cantidad/comprimido (mg)</u>	<u>Cantidad/lote (kg)</u>
Palmitato de vitamina A a 500K UI/gm (UI)	5000 UI	30	13,000	6,500
Vitamina D3 a 850K UI/g (UI)	400 UI	30	0,612	0,306
Succinato de vitamina E (D-α) @ 1210 UI/g (UI)	15 UI	5	13,017	6,508
Vitamina C (mg)	30 mg	2	30,600	15,300
Tiamina HCl a 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
Piridoxina HCl a 82,3 % (mg)	2 mg	5	2,552	1,276
Triturado de ácido fólico 1,0 % (mcg)	400 mcg	25	50,000	25,000
Triturado de vitamina B-12 1,0 % (mcg)	6 mcg	20	0,720	0,360
Ácido pantoténico (Pan. Cal.) (mg)	10 mg	5	10,500	5,250
Triturado de biotina 1,0 % (mcg)	30 mcg	20	3,600	1,800
Calcio (fosfato dicálcico) 29,46 % (mg)	100 mg	0	344,119	172,060
Fósforo (fosfato dicálcico) 22,77 % (mg)	75 mg	0	0,000	0,000
Magnesio (MgO) 60,32 % (mg)	20 mg	0	33,156	16,578
Cinc (ZnO) 80,34 (mg)	5 mg	0	6,224	3,112
Yodo (KI) 76,45 % (mcg)	150 mcg	0	0,196	0,098
Cobre ((Gluconato) 14,00 % (mg)	2 mg	0	14,286	7,143
manganeso (Gluconato) 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 sódica			20,250	10,125
Ácido esteárico			13,500	6,750
Estearato de magnesio			5,063	2,531
TOTAL			775,000	337,500

*Cantidad en porcentaje del ingrediente o encima de lo indicado en la etiqueta para llegar a la cantidad indicada en la etiqueta.

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de polifenol purificado a partir de uvas producido de acuerdo con el procedimiento A o el procedimiento B,

en el que el procedimiento A comprende:

- 5 (1) poner en contacto un miembro seleccionado del grupo que consiste en uvas enteras, semillas de uvas, residuos de hollejos de uva y mezclas de los mismos con agua a una temperatura elevada para obtener un extracto bruto de uva-agua; y (2) tratar el extracto bruto de uva-agua con un cultivo vivo seleccionado del grupo que consiste en levaduras, bacterias, hongos y mezclas de los mismos a una temperatura elevada para obtener el extracto de polifenol purificado;

10 en el que el procedimiento B comprende:

- (1) poner en contacto un miembro seleccionado del grupo que consiste en uvas enteras, semillas de uvas, residuos de hollejos de uva y mezclas de los mismos con agua a una temperatura elevada para obtener un extracto bruto de uva-agua; y (2) tratar el extracto bruto de uva-agua con una enzima tanasa a una temperatura elevada para obtener el extracto de polifenol purificado,

15 en el que el extracto comprende 2 % en peso o menos de unidades terminales de epicatequina-galato y 12 % en peso o menos de unidades de extensión de epicatequina-galato.

2. Un extracto de polifenol purificado a partir de uvas, en el que el extracto comprende aproximadamente 2 % en peso o menos de unidades terminales de epicatequina-galato, 12 % en peso o menos de unidades de extensión de epicatequina-galato y el 5 – 15 % de monómeros, 5 – 20 % de dímeros, a 3 – 10 % de trímeros, 2 – 10 % de tetrámeros y 2 – 10 % de pentámeros en peso.

3. El extracto de la reivindicación 1, que comprende 5 - 15 % de monómeros, 5 - 20 % de dímeros, 3 - 10 % de trímeros, 2 - 10 % de tetrámeros y 2 - 10 % de pentámeros en peso.

4. El extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cantidad total de monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros está entre 25 y 50 % en peso.

25 5. El extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende el 80 % en peso o más o el 90 % en peso o más de los compuestos fenólicos totales.

6. El extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende el 1 % en peso o menos de unidades terminales de epicatequina-galato.

30 7. El extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende el 5 % en peso o menos de unidades de extensión de epicatequina-galato.

8. Un suplemento dietético, un alimento, una bebida o un producto nutracéutico que comprende un extracto de polifenoles de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. El extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el extracto contiene 400 - 1500 ppm de ácido gálico.

35

Figura 1: Cambios en la presión arterial sistólica

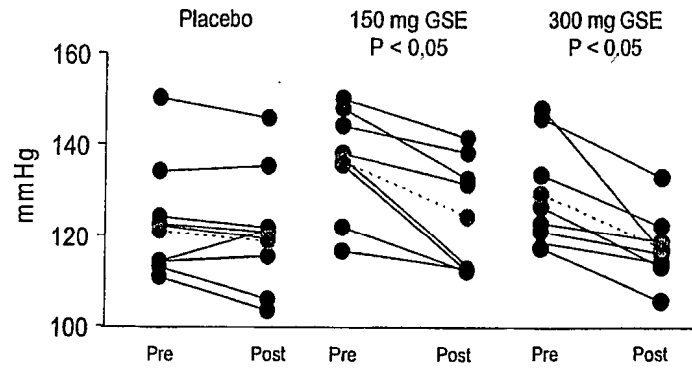


Figura 2: Cambios en la presión arterial diastólica

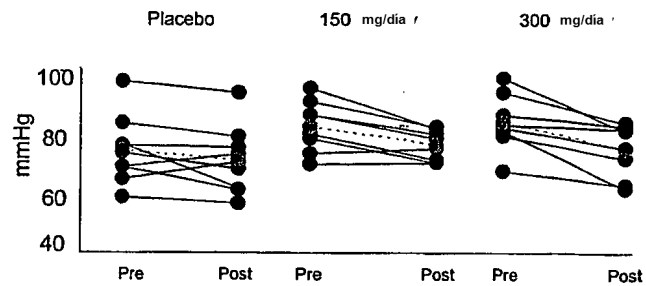


Figura 3: Cambios en LDL oxidada

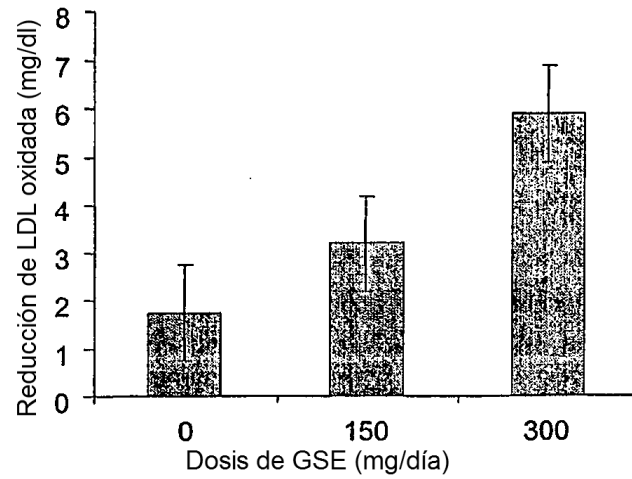


Figura 4: Relación entre el cambio en LDL oxidada y la concentración basal de LDL oxidada (300 mg de MegaNatural®-BP)

