

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 086**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23L 2/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2011 E 11802232 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2648741**

54 Título: **Agentes cardioprotectores procedentes del kiwi**

30 Prioridad:

07.12.2010 US 420499 P
26.05.2011 US 201161490246 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DUTTARROY, ASIM KANTI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 561 086 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

Agentes cardioprotectores procedentes del kiwi

Campo de la invención

La invención se refiere a fracciones de extractos cardioprotectores preparados a partir del kiwi.

5 Antecedentes de la invención

Se sabe que un elevado consumo de frutas y vegetales es una importante medida preventiva por la cual se puede disminuir el riesgo de enfermedades vasculares y determinados cánceres vinculados a factores de la nutrición incluyendo cáncer de estómago, de colon, de mama, y de próstata. Un factor implicado en el inicio y desarrollo de enfermedades vasculares y de cánceres es la incidencia de procesos anómalos de estrés oxidativo que conducen a la generación de radicales o compuestos hidroxilo y peroxi libres. En parte, el efecto beneficioso de la ingestión de frutas y vegetales se explica por los antioxidantes conocidos por su acción inhibidora, entre los que se incluyen la vitamina C, la vitamina E y los carotenoides tales como los alfa y beta carotenoides, licopeno luteína, etc. Sin embargo, muchos datos recientes también indican un papel de las propiedades no antioxidantes de algunos compuestos de las frutas en diferentes enfermedades.

Se han realizado esfuerzos considerables en la identificación de compuestos bioactivos procedentes de frutas y vegetales que pueden tener un papel en la prevención de algunas enfermedades. Se ha pensado que las frutas y los vegetales son beneficiosos en las enfermedades cardiovasculares. Los efectos beneficiosos de las frutas y de los vegetales pueden explicarse por los antioxidantes y los componentes bioactivos no antioxidantes contenidos en los anteriores. Estos compuestos pueden funcionar individualmente o de forma concertada para proteger a las lipoproteínas y a las células vasculares de la oxidación, o por otros mecanismos (rutas no antioxidantes) tales como una reducción en los niveles de lípidos en plasma (colesterol LDL, triglicéridos), y la respuesta de la agregación plaquetaria (1,2).

Se necesitan preparaciones adicionales de frutas y vegetales que proporcionen propiedades cardioprotectoras y otras propiedades beneficiosas.

Duttaroy y col. (2004) Platelets (15) N° 5, pp 287-292 desvelan una preparación de zumo de kiwi. Se ha mostrado la inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro*. Kyung-Ah y col., (2005) Biol. Pharm. Bull. (28) N° 9, págs. 1782-1785, divulgan una preparación de un extracto de kiwi en forma de polvo que se conservó a 4 °C. El extracto tenía actividades antioxidantes, antihipertensivas, antihipercolesterolémicas, fibrinolíticas y de inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina *in vitro*.

Takeshi y col. (2008) J. Food Agric. Envir. (6) No. 3-4, pp. 11-14 desvelan la preparación de zumo de fruta procedente de la vid de plata (*Actinidia polygama*). El zumo ha mostrado inhibir la enzima convertidora de la angiotensina.

Sumario de la invención

Se describen agentes cardioprotectores de frutas. En particular, extractos cardioprotectores y sus fracciones preparados a partir de kiwis.

Se describe una composición que comprende, en todo o en parte, un extracto de fruta procedente de una fruta de la familia *Actinidia*, caracterizado dicho extracto por ser estable y retener la actividad biológica durante el almacenamiento. Se describe también un extracto o fracción de fruta procedente de una fruta de la familia *Actinidia*, dicho extracto estabilizado para retener la actividad biológica durante el almacenamiento, y que el extracto o fracción de fruta se puede estabilizar mediante tratamiento térmico, donde el tratamiento térmico puede ser suficiente para estabilizar la actividad biológica del extracto. Se describe un tratamiento térmico que comprende calentar hasta aproximadamente 70 a 120 grados centígrados, y más preferentemente hasta aproximadamente 80 a 100 grados centígrados. Se describe también que el extracto o fracción de fruta puede estabilizarse mediante la eliminación de enzimas de la fracción, por ejemplo, mediante ultrafiltración.

La invención se refiere a una fracción activa procedente de un extracto de kiwi, siendo menor el tamaño de las moléculas en la fracción activa inferior a 1000 daltons y en el que dicha fracción inhibe la agregación plaquetaria e inhibe la enzima convertidora de la angiotensina. En algunas realizaciones, dicha fracción inhibe la agregación plaquetaria en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria e inhibe la enzima convertidora de la angiotensina en un ensayo *in vitro* de la enzima convertidora de la angiotensina. En algunas realizaciones, la fracción tiene más de un 4 % de actividad inhibidora en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria tras mantenerse a 4 grados centígrados durante 24 días normalizado al día 0. En algunas realizaciones, la fracción puede caracterizarse además por retener al menos un 80 % de la actividad biológica de dichas moléculas biológicamente activas cuando se almacena durante 4 días, o al menos 18 o 24 días, a 4 grados centígrados en comparación con una fracción de extracto reciente, en la que dicha actividad biológica es la inhibición de la agregación plaquetaria en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria.

El extracto o la fracción descritos se pueden deslipidizar. La fracción comprende moléculas biológicamente activas con un peso molecular de menos de 1000 daltons. En algunas realizaciones, la fracción de fruta presenta unos máximos principales a aproximadamente 1,30 a 1,81 minutos en un barrido de espectro de UV de una cromatografía líquida de dicho extracto en una columna C18 Zorbax de 1,8 µM con una resolución rápida de partículas (4,6 mm x 50 mm, 1,8 µm) con una fase móvil del 100 % (A) agua- ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) a 100 % de B acetonitrilo-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) durante 35 minutos. La fracción puede presentar unos máximos principales en el espectro del UV que se observan en la Figura 6. En algunas realizaciones, la fracción de fruta presenta máximos principales a aproximadamente 1,61, 30,18, y 30,87 en una espectrometría de masas 100-1000 Pm en un barrido en modo negativo de una cromatografía líquida de dicho extracto en una columna C18 Zorbax de 1,8 µM de resolución rápida de partículas (4,6 mm x 50 mm, 1,8 µm) con una fase móvil del 100 % (A) agua- ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) a 100 % de B acetonitrilo-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) durante 35 minutos. La fracción puede presentar unos máximos principales en el cromatograma de corriente de iones que se observan en la Figura 7.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un jarabe o solución que comprende un extracto o fracción como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un polvo que comprende el extracto o fracción como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un vehículo de administración oral que comprende el extracto o fracción, o jarabe, solución o polvo del mismo como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un alimento o comestible funcional que comprende la composición, jarabe, solución o polvo como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el alimento o comestible funcional se selecciona entre el grupo que consiste en bebidas, productos horneados, pudines, productos de leche fresca, productos de confitería, aperitivos, productos de confitería congelados o innovaciones, alimentos congelados preparados, golosinas, aperitivos, sopas, pastas para untar, salsas, aderezos para ensaladas, productos cárnicos preparados, queso, y yogur. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un suplemento nutritivo que comprende la composición, jarabe, solución o polvo como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el suplemento nutritivo se selecciona entre el grupo que consiste en cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, cápsulas masticables, barritas saludables, y polvos para suplemento.

La presente invención describe procedimientos para prevenir o tratar una patología iniciada o caracterizada por la activación y/o agregación plaquetaria, mejorar o mantener la salud del corazón, mejorar o mantener la salud cardiovascular, mejorar o mantener la salud circulatoria, o mejorar o mantener el flujo sanguíneo en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un extracto o fracción de fruta, o jarabe, polvo, vehículo de administración oral o producto nutritivo como se ha descrito anteriormente. En alguna opción, la administración inhibe la agregación plaquetaria. En algunas opciones, la administración da como resultado una actividad antitrombótica. En algunas opciones, la administración da como resultado una fluidificación de la sangre. En algunas opciones, la administración da como resultado una reducción de la presión sanguínea.

En algunas opciones, la presente invención proporciona el uso del extracto o fracción, o jarabe, polvo, vehículo de administración oral o producto nutritivo como se ha descrito anteriormente para prevenir o tratar una patología iniciada o caracterizada por la activación y/o agregación plaquetaria, mejorar o mantener la salud del corazón, mejorar o mantener la salud cardiovascular, mejorar o mantener la salud circulatoria, o mejorar o mantener el flujo sanguíneo en un sujeto, o mejorar o mantener la presión sanguínea en un sujeto. En algunas opciones, la patología iniciada o caracterizada por la activación y/o agregación plaquetaria se selecciona entre el grupo que consiste en trombosis, arterioesclerosis y/o formación de placa.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procesos para producir un extracto de *Actinidia* estable y biológicamente activo que comprende producir un extracto de *Actinidia* y calentar el extracto de *Actinidia* en condiciones tales que el extracto retenga la actividad biológica durante el almacenamiento. En algunas realizaciones, la etapa de calentamiento comprende calentar dicha fracción a aproximadamente 70 a aproximadamente 100 grados centígrados durante más de aproximadamente cinco minutos. En algunas realizaciones, el extracto de *Actinidia* se produce haciendo sedimentar un zumo u homogenado de *Actinidia* bien antes o después de calentar para proporcionar una fracción de sedimento y una fracción de sobrenadante, y retener dicha fracción de sobrenadante para proporcionar dicho extracto de *Actinidia* biológicamente activo. En algunas realizaciones, la etapa de sedimentación comprende la centrifugación a al menos 3000 g. En algunas realizaciones, el extracto se procesa adicionalmente mediante ultrafiltración bien antes o después del calentamiento. La ultrafiltración tiene un corte de 1000 Daltons.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un extracto de *Actinidia* estable y biológicamente activo producido mediante los anteriores procesos. En algunas realizaciones, el extracto de *Actinidia* estable y biológicamente activo máximos principales a aproximadamente 1,30 a 1,81 minutos en un barrido de espectro de UV de una cromatografía líquida de dicho extracto en una columna C18 Zorbax de 1,8 µM con una resolución rápida de partículas (4,6 mm x 50 mm, 1,8 µm) con una fase móvil del 100 % (A) agua- ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) a 100 % de B acetonitrilo-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) durante 35 minutos y máximos principales a aproximadamente 1,61, 30,18, y 30,87 en una espectrometría de masas 100-1000 Pm en un barrido en modo negativo de una cromatografía líquida de dicho extracto en una columna C18 Zorbax de 1,8 µM de resolución rápida de partículas (4,6 mm x 50 mm, 1,8 µm) con una fase móvil del 100 % (A) agua- ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) a 100 % de B acetonitrilo-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) durante 35 minutos, y en el que dicho extracto inhibe la agregación plaquetaria en un ensayo

in vitro de agregación plaquetaria. En algunas realizaciones, el extracto de *Actinidia* estable y biológicamente activo descrito anteriormente se caracteriza por retener más de un 4 % de actividad biológica de dichas moléculas biológicamente activas cuando se almacena durante al menos 24 días a 4 grados centígrados en comparación con una fracción de extracto reciente, en la que dicha actividad biológica es la inhibición de la agregación plaquetaria en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona una fracción de extracto de fruta, en el que la fracción comprende moléculas biológicas con un peso molecular inferior a 1000 daltons. En algunas realizaciones, el extracto se deslipidiza. En algunas realizaciones, la fruta es una fruta de la familia *Actinidia*. En algunas realizaciones, el extracto se estabiliza mediante tratamiento térmico. En algunas realizaciones, el tratamiento térmico comprende calentar a aproximadamente de 70 a 100 grados centígrados. En algunas realizaciones, el extracto de fruta presenta unos máximos principales a aproximadamente 1,30 a 1,81 minutos en un barrido de espectro de UV de una cromatografía líquida de dicho extracto en una columna C18 Zorbax de 1,8 μM con una resolución rápida de partículas (4,6 mm x 50 mm, 1,8 μm) con una fase móvil del 100 % (A) agua-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) a 100 % de B acetonitrilo-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) durante 35 minutos. En algunas realizaciones, el extracto presenta unos máximos principales en el espectro del UV que se observan en la Figura 6. En algunas realizaciones, el extracto de fruta presenta máximos principales a aproximadamente 1,61, 30,18, y 30,87 en una espectrometría de masas 100-1000 Pm en un barrido en modo negativo de una cromatografía líquida de dicho extracto en una columna C18 Zorbax de 1,8 μM de resolución rápida de partículas (4,6 mm x 50 mm, 1,8 μm) con una fase móvil del 100 % (A) agua-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) a 100 % de B acetonitrilo-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) durante 35 minutos. En algunas realizaciones, el extracto presenta unos máximos principales en el cromatograma de corriente de iones totales que se observan en la Figura 7.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una fracción de extracto de *Actinidia* que comprende moléculas biológicamente activas con un peso molecular inferior a 1000 daltons, en el que dicho extracto de fruta presenta unos máximos principales a aproximadamente 1,30 a 1,81 minutos en un barrido de espectro de UV de una cromatografía líquida de dicho extracto en una columna C18 Zorbax de 1,8 μM con una resolución rápida de partículas (4,6 mm x 50 mm, 1,8 μm) con una fase móvil del 100 % (A) agua-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) a 100 % de B acetonitrilo-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) durante 35 minutos y máximos principales a aproximadamente 1,61, 30,18, y 30,87 en una espectrometría de masas 100-1000 Pm en un barrido en modo negativo de una cromatografía líquida de dicho extracto en una columna C18 Zorbax de 1,8 μM de resolución rápida de partículas (4,6 mm x 50 mm, 1,8 μm) con una fase móvil del 100 % (A) agua-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) a 100 % de B acetonitrilo-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) durante 35 minutos, y en el que dicho extracto inhibe la agregación plaquetaria en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procesos para producir un extracto de *Actinidia* estable y biológicamente activo que comprende fraccionar zumo de una fruta de *Actinidia* para producir una fracción de extracto y calentar dicha fracción de extracto hasta de aproximadamente 70 a aproximadamente 100 grados centígrados. En algunas realizaciones, el fraccionamiento comprende el fraccionamiento por tamaño. En algunas realizaciones, el calentamiento comprende calentar dicha fracción a los mencionados de aproximadamente 70 a aproximadamente 100 grados centígrados durante más de aproximadamente cinco minutos. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un extracto de *Actinidia* estable y biológicamente activo producido mediante el anterior procedimiento. En algunas realizaciones, el extracto de *Actinidia* estable y biológicamente activo presenta unos máximos principales a aproximadamente 1,30 a 1,81 minutos en un barrido de espectro de UV de una cromatografía líquida de dicho extracto en una columna C18 Zorbax de 1,8 μM con una resolución rápida de partículas (4,6 mm x 50 mm, 1,8 μm) con una fase móvil del 100 % (A) agua-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) a 100 % de B acetonitrilo-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) durante 35 minutos y máximos principales a aproximadamente 1,61, 30,18, y 30,87 en una espectrometría de masas 100-1000 Pm en un barrido en modo negativo de una cromatografía líquida de dicho extracto en una columna C18 Zorbax de 1,8 μM de resolución rápida de partículas (4,6 mm x 50 mm, 1,8 μm) con una fase móvil del 100 % (A) agua-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) a 100 % de B acetonitrilo-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) durante 35 minutos, y en el que dicho extracto inhibe la agregación plaquetaria en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un esquema de un procedimiento para el fraccionamiento parcial de extractos de kiwi.

La Figura 2 muestra la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por la actividad de ADP por el extracto.

La Figura 3 muestra la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por el ácido araquidónico.

La Figura 4 muestra los efectos del EK sobre la actividad de ACE en el suero humano.

La Figura 5 muestra el barrido de UV de una fracción deslipidizada ultrafiltrada purificada de extracto de kiwi.

La Figura 6 proporciona un cromatograma de un barrido a 200-400 nm en el espectro del UV de un extracto de kiwi de la presente invención.

La Figura 7 proporciona un cromatograma de un barrido de EM a 100-1000 Pm en modo negativo de un extracto de kiwi de la presente invención.

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, el término 'fracción' se refiere a un extracto parcialmente purificado o compuestos purificados a partir de un extracto.

5 Las expresiones "purificado" o "para purificar" significan el resultado de cualquier proceso que elimina parte de un contaminante del componente de interés, tal como los componentes responsables de la inhibición de la agregación plaquetaria. El porcentaje de un componente purificado aumenta por tanto en la muestra.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "transportador fisiológicamente aceptable" se refiere a cualquier transportador o excipiente comúnmente utilizado en composiciones farmacéuticas oleosas. Dichos transportadores o excipientes incluyen, pero sin limitación, aceites, almidón, sacarosa y lactosa.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo de administración oral" se refiere a cualquier medio de administración de una composición farmacéutica por vía oral, incluyendo, pero sin limitación, cápsulas, píldoras, comprimidos y jarabes.

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "producto alimenticio" se refiere a cualquier alimento o comestible adecuado para su consumo por seres humanos, animales no rumiantes, o animales rumiantes. El "producto alimenticio" puede ser un alimento preparado y envasado (por ejemplo, mayonesa, aderezo para ensaladas, pan, o un alimento a base de queso) o un alimento animal (por ejemplo, un alimento animal extrudido o granulado o un alimento mixto grueso). "Producto alimenticio preparado" significa cualquier alimento preenvasado homologado para el consumo humano.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "comestible" se refiere a cualquier sustancia adecuada para el consumo humano o animal.

25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "alimento funcional" se refiere a cualquier alimento fresco o alimento procesado reivindicado por tener propiedades promotoras de la salud y o que previenen la enfermedad más allá de la función nutritiva básica de suministrar nutrientes. Los alimentos funcionales se denominan algunas veces nutracéuticos. La categoría funcional incluye alimentos procesados preparados a partir de ingredientes alimenticios funcionales, o reforzados con aditivos promotores de la salud, productos de tipo "enriquecidos con vitaminas", y también, alimentos frescos (por ejemplo, vegetales) que tienen vinculadas reivindicaciones específicas. Los alimentos fermentados con cultivos vivos se consideran también a menudo como alimentos funcionales con beneficios probióticos.

30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "suplemento nutritivo" se refiere a un producto alimenticio formulado como un suplemento de la dieta o nutriente que se va a usar como parte de la dieta.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a agentes cardioprotectores. En particular, la presente invención se refiere a extractos y fracciones cardioprotectoras de los mismos preparados a partir del kiwi.

35 El kiwi es el cultivo mejor conocido del género *Actinidia* (3). Aunque las ventas de frutas de *Actinidia* en el mercado internacional está dominada por un único cultivar del kiwi *Actinidia deliciosa* "Hayward," existe un considerable número de cultivos y selecciones del género que tienen una forma, tamaño, y vellosidad muy diversos. Frecuentemente ofrecen una amplia variación en los atributos sensoriales tales como el color de la pulpa, el aroma, y el sabor, y en atributos nutritivos tales como el nivel de vitamina C, polifenoles, y contenido de carotenoides (4,5). Están disponibles pocos tipos de productos alimenticios procesados procedentes del kiwi para los consumidores.

40 Los kiwis se suelen consumir principalmente como frutas enteras. Los pocos ejemplos donde se ha procesado kiwi para obtener productos incluyen postres congelados y mezclas de zumos y, de forma más reciente, una pocas bebidas naturales de kiwi tales como Kiwi Crush™ (Vital Food Processors Ltd, Manukau City, Auckland, Nueva Zelanda). Los extractos de kiwi que contienen los componentes nutritivos de la fruta son composiciones bioactivas deseables que incluyen polifenoles, ácido ascórbico y polisacáridos solubles en agua (polisacáridos pécticos), que

45 pueden ser ventajosos en aplicaciones de alimento funcionales, aumentando la gama de productos del kiwi disponibles para los consumidores (3). Con el creciente interés por la salud, cada vez existe una mayor demanda de los consumidores por alimentos nutritivos aceptables con múltiples beneficios para el consumidor que incluyen beneficios para la salud definidos, mayor comodidad y reducción en el contenido de aditivos.

50 Las plaquetas están implicadas en el desarrollo de la aterosclerosis, y los acontecimientos trombóticos y, por tanto, la reducción de la actividad plaquetaria por las medicaciones reduce la incidencia y la gravedad de la enfermedad (1). Los experimentos realizados durante el curso del desarrollo de las realizaciones de la presente invención evaluaron si el consumo de kiwi moduló la actividad plaquetaria y los lípidos en plasma en voluntarios humanos sanos en un estudio cruzado aleatorizado. Se ha notificado que el consumo de dos o tres kiwis al día durante 28 días redujo la respuesta de agregación plaquetaria al colágeno y ADP en un 18 % en comparación con los controles

55 (6). Además, el consumo de kiwis disminuyó los niveles de triglicéridos en sangre en un 15 % en comparación con el control, aunque no se observaron dichos efectos en el caso de los niveles de colesterol en plasma. Todos estos

datos indican que el consumo de kiwis es beneficioso en la patología cardiovascular. La incubación de extracto de kiwi (EK expresado como peso de pulpa utilizado para preparar el EK) inhibió la agregación plaquetaria pero no era una preparación óptima ya que requiere una buena cantidad de pulpa; además, la actividad puede perderse en el almacenamiento incluso a 4 grados centígrados debido a reacciones indeseables en el zumo. Además, se cree que los taninos y el aceite de las semillas (y en menor extensión el pelo) pueden reaccionar con la pulpa muy ácida para producir olor y color indeseables. Muchas especies de kiwi tienen un pelo fino que es difícil de eliminar de un zumo. Se prefieren los procedimientos de ablandamiento de la pulpa y se considera deseable evitar la desintegración excesiva de células y la fragmentación de los componentes de la fruta tales como la semilla. Las semillas pueden contener sustancias tóxicas (por ejemplo, semilla de albaricoque) o contribuyen a aromas desagradables o indeseables en un zumo.

Muchos frutos son ácidos y los que tienen un pH de 6 o menos es más probable que estén afectados. Ampliamente usada y relativamente barata, la sacarosa es alcalina y parece inducir o participar en otras reacciones adicionalmente indeseables cuando se añade a una pulpa ácida. La investigación que ha conducido a las realizaciones de la presente invención ha indicado que las sustancias que forman parte de un zumo procedente de una fragmentación de semillas o de un daño excesivo de las células contribuyen a factores que afectan de forma adversa a la producción satisfactoria de zumo de kiwi, tales como los problemas de oscurecimiento y ocultación. El kiwi es más ácido que la mayoría y tiene un pH de aproximadamente 3. Esto puede también evitar las posibles reacciones secundarias que contribuyen a la ocultación, decoloración, etc. La glucosa y la fructosa se encuentran habitualmente en muchas frutas. Normalmente, esto enmascara algunas de las propiedades indeseables de la fruta tales como el amargor o el exceso de acidez y es debido en parte a la afinidad del ser humano medio por el sabor dulce. En algunas realizaciones, los productos de zumo no se han pasteurizado como es característico en la mayoría de otros zumos y procesos. Por tanto, cualquiera de los efectos conservantes a los que contribuya el agente edulcorante ayudarán a prolongar la vida media del producto. Es posible que la alteración del pH resultante de la combinación pueda dar lugar a reacciones secundarias indeseables. Adicionalmente, se ha señalado que, durante el almacenamiento, la química de la mayoría de los zumos variará. Para el kiwi, el contenido en ácido del zumo disminuirá. De acuerdo con ello, en algunas realizaciones, la adición de un tampón adecuado o de un agente de ajuste del pH ayudará a preservar el pH del producto durante un periodo más largo. Esto aplaza también las posibles reacciones a largo plazo indeseables que dan como resultado un oscurecimiento o decoloración del zumo.

En algunas realizaciones, las fracciones activas de la fruta, y en particular del kiwi, se utilizan en una variedad de formulaciones y se añaden preferentemente a cualquier matriz para el consumo humano que sea conocida en la materia. En algunas realizaciones preferidas, las fracciones activas se caracterizan por tener una elevada eficacia para un uso concreto, tal como la prevención de la agregación o la adhesión plaquetaria, por estar sustancialmente exentas de materiales inactivos, por tener una vida media aumentada en comparación con las fracciones activas sin tratar. En algunas realizaciones, las fracciones se producen mediante un proceso donde se centrifuga se filtra, y se deslipidiza una fracción de zumo o pulpa para proporcionar inhibidores de plaquetas muy enriquecidos (es decir, más de 10, 20, o 30 veces y hasta aproximadamente 50 veces o 100 veces en comparación con el zumo bruto, sin procesar). Este proceso produce una fracción activa con una vida media aumentada y que es estable al calentamiento. En algunas realizaciones preferidas, la fracción activa se trata térmicamente para aumentar adicionalmente la estabilidad. En realizaciones adicionales, se proporciona un producto reconstituido a partir de una fracción activa como se ha descrito anteriormente. La presente invención se ha desarrollado para miembros del género *Actinidia*. Los productos de fruta, diferentes de un zumo, están también incluidos en el alcance de las realizaciones de la invención. Esta fruta tiene generalmente un pH bajo (3,0-3,5), padece oscurecimiento tras la exposición del zumo al aire y tiene contenido de clorofila. Se prevé que, aunque el proceso de la invención sea adecuado para otras frutas, la mayor ventaja posiblemente se aplique a frutas que tienen problemas y características en común con el kiwi, por ejemplo, un pH de menos de 4,5, niveles de cloroplastos significativos, u ocultamiento (por ejemplo, la fruta de *Monstera deliciosa*). No debe inferirse que el beneficio de la invención se limita a estos tipos de fruta. La invención ha identificado varias áreas problemáticas, especialmente para el kiwi, y resuelve sus necesidades.

Los experimentos realizados durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención han demostrado que el EK tiene la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria, y reducir *in vitro* la actividad convertidora de la angiotensina (ACE). Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que las composiciones que contienen EK son de utilidad en la prevención de la patología cardiovascular, por ejemplo los infartos de miocardio, y los ictus y en la prevención de acontecimientos tromboembólicos adicionales en pacientes que han padecido infarto de miocardio, ictus o angina inestable. Además, dicha composición es de utilidad en la prevención de la restenosis tras angioplastia y procedimientos de derivación. Además, el EK es de utilidad en el tratamiento de la patología coronaria resultante de trastornos tromboembólicos tales como IM junto con tratamiento trombolítico. Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que los compuestos responsables de la actividad de agregación antiplaquetaria son compuestos solubles en agua que tienen una estructura muy diferente a la de los compuestos solubles en lípidos. Existen muchos agentes de agregación antiplaquetaria conocidos que actúan en diferentes etapas de la producción y acción plaquetaria. La aspirina (ácido acetilsalicílico) es el más ampliamente usado y estudiado. Se han utilizado también el dipiridamol y la ticlopidina. La actividad antiplaquetaria de la aspirina se debe a la inhibición irreversible de la ciclooxigenasa plaquetaria, impidiendo de esta manera la síntesis de tromboxano A₂, un compuesto que produce la agregación plaquetaria. El ibuprofeno es un inhibidor reversible de la ciclooxigenasa plaquetaria. Algunos

compuestos son inhibidores directos de la tromboxano A₂ sintetasa, por ejemplo pirmagrel, o actúan como antagonistas de los receptores del tromboxano, por ejemplo sulotroban.

5 La presente invención no se limita a un mecanismo concreto. De hecho, no es necesaria una comprensión del mecanismo para llevar a la práctica la presente invención. No obstante, los resultados descritos en el presente documento indican que los principios activos del extracto de fruta pueden afectar a una o más etapas de las rutas que conducen a la producción de tromboxano A₂ anteriormente a la aspirina y otros fármacos antiplaquetarios actualmente disponibles. Se sabe bien que los efectos adversos son incidencias comunes con las dosis terapéuticas de la aspirina; siendo los principales efectos perturbaciones gastrointestinales tales como náuseas, dispepsia, y vómitos. Se anticipa por tanto que los compuestos aislados que inhiben la agregación plaquetaria en el extracto de fruta encuentran uso como una alternativa deseable a la aspirina y otros fármacos antiplaquetarios en la prevención de acontecimientos tromboembólicos y enfermedad coronaria.

De acuerdo con ello, en algunas realizaciones, la invención proporciona un extracto de fruta, una fracción activa del mismo, o uno o más compuestos activos aislables del anterior, para su uso en la profilaxis o tratamiento de una patología iniciada o caracterizada por la agregación plaquetaria.

15 En realizaciones adicionales, la invención proporciona un extracto de fruta o fracción activa del mismo o uno o más compuestos aislables del mismo para su uso como agente antitrombótico.

20 En otras realizaciones adicionales, la invención proporciona un extracto de fruta o fracción activa del mismo o uno o más compuestos aislables del mismo como se ha definido aquí anteriormente en la fabricación de un medicamento para su uso en la profilaxis o tratamiento de una patología iniciada o caracterizada por la agregación plaquetaria; o para su uso como inhibidor de la agregación plaquetaria o para su uso como agente antitrombótico.

25 En algunas realizaciones, la invención proporciona un proceso para la fabricación de una medicina para su uso (i) en la profilaxis o tratamiento de una patología iniciada, mediada o caracterizada por agregación plaquetaria, o (ii) como inhibidor de la agregación plaquetaria, o como (iii) agente antitrombótico: proceso que se caracteriza por el uso, como ingrediente esencial del medicamento, de una fruta, o un extracto o fracción activa de la misma o uno o más componentes aislables de la misma como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un componente activo procedente de una fruta o de un extracto o de una fracción activa o de uno o más compuestos aislables de los mismos tal como se ha definido anteriormente en el presente documento y un transportador farmacéuticamente aceptable.

30 En algunas realizaciones, la invención proporciona un extracto de fruta, una fracción activa del mismo, o uno o más compuestos activos aislables del anterior, para su uso en el apoyo de la salud cardiovascular.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un extracto de fruta, una fracción activa del mismo, o uno o más compuestos activos aislables del anterior, para su uso en el apoyo de la salud del corazón.

35 En otras realizaciones, la invención proporciona un extracto de fruta o fracción activa del mismo o uno o más compuestos aislables del mismo para su uso como inhibidor de la agregación plaquetaria.

En otras realizaciones, la invención proporciona un extracto de fruta o fracción activa del mismo o uno o más compuestos aislables del mismo para su uso en la promoción y el mantenimiento de la salud del corazón y/o la salud circulatoria.

40 En otras realizaciones, la invención proporciona un extracto de fruta o fracción activa del mismo o uno o más compuestos aislables del mismo para su uso en la mejora, el mantenimiento y la promoción del flujo sanguíneo, y en particular del flujo laminar de la sangre.

45 Se prefiere que el extracto de fruta utilizado de acuerdo con la invención sea uno de aquellos que no son tóxicos a los seres humanos y, normalmente, las frutas que se consideran usualmente son frutas comestibles. De esta manera, las frutas pueden contener o no semillas o huesos, pero tienen una pulpa comestible esencialmente no oleosa.

50 El kiwi es el cultivo mejor conocido del género *Actinidia*. Los extractos de las realizaciones de la invención pueden prepararse homogeneizando la pulpa de un kiwi pelado y a continuación eliminando los sólidos del anterior, por ejemplo, mediante centrifugación. De esta manera, el extracto es normalmente un extracto acuoso, que puede consistir o comprender el zumo de la fruta, opcionalmente con la adición extra de agua añadida durante la etapa de homogeneización. Dichos extractos acuosos pueden concentrarse, enriquecerse o condensarse mediante, por ejemplo, técnicas convencionales, por ejemplo, evaporación a presión reducida. Los ejemplos de concentrados son aquellos que se han concentrado al menos 2 veces, más habitualmente, al menos 4 veces, por ejemplo, al menos 8 veces, o al menos 40 veces o al menos 100 veces o al menos 200 veces o al menos 1000 veces.

El extracto puede fraccionarse para aislar una o más fracciones activas del anterior mediante, por ejemplo, filtración de pesos moleculares, o cromatografía sobre un soporte adecuado tal como gel de sefarosa (para la cromatografía de exclusión por tamaño) o la eliminación de lípidos (mediante Lipidex-1000) o mediante tratamientos con disolventes, o columna de intercambio iónico utilizando HPLC sobre sílice o alúmina tratadas adecuadamente, por ejemplo, sílice revestida con ODS, o extracción con disolventes.

Los experimentos llevados a cabo con el extracto de fruta de kiwi han revelado que los principios activos del extracto pasan a través de una ultrafiltración que tiene un corte de pesos moleculares de 1000, es incoloro, soluble en agua y no pierde la actividad cuando hierve. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un proceso para producir un extracto de *Actinidia* estable y biológicamente activo que comprende fraccionar zumo de una fruta de *Actinidia* para producir una fracción de extracto y calentar la fracción de extracto hasta de aproximadamente 70 a aproximadamente 120 grados centígrados, preferentemente de 80 a 100 grados centígrados, y lo más preferente de aproximadamente 95 a 100 grados centígrados. En algunas realizaciones, la duración del calentamiento es de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 minutos, preferentemente aproximadamente 10 a aproximadamente 25 minutos, y lo más preferente aproximadamente 20 minutos, o más, en más de aproximadamente 5, 10, o 15 minutos. La presente invención proporciona un proceso para producir un extracto de *Actinidia* estable y biológicamente activo que comprende fraccionar zumo de una fruta de *Actinidia* para producir una fracción de extracto y someter la fracción a ultrafiltración con un corte de pesos moleculares inferior a 1 kDa. En algunas realizaciones, la fracción activa estabilizada comprende moléculas biológicamente activas y se caracteriza por retener al menos un 80 % de la actividad biológica de dichas moléculas biológicamente activas cuando se almacena al menos 4 días, 18 días o 24 días hasta aproximadamente 30 o 40 días a 4 grados centígrados en comparación con una fracción de extracto fresco. En algunas realizaciones, la actividad biológica es la inhibición de la agregación plaquetaria en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria o la inhibición de la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina.

En algunas realizaciones preferidas, el extracto de *Actinidia* estable y biológicamente activo producido mediante este procedimiento presenta máximos principales a aproximadamente 1,30 y 1,81 minutos en un cromatograma del espectro UV y máximos principales a aproximadamente 1,61, 30,18, y 30,87 en un cromatograma de corriente de iones totales y en el que dicho extracto inhibe la agregación plaquetaria en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria.

De acuerdo con ello, la divulgación proporciona también su uso como agente antitrombótico, o su uso como inhibidor de la agregación plaquetaria, o para su uso en la profilaxis o tratamiento de una patología iniciada o caracterizada por la agregación plaquetaria, una fracción activa de un extracto de fruta (por ejemplo, extracto de kiwi), conteniendo la fracción activa compuestos solubles en agua incoloros o de un color paja claro sustancialmente estables al calor con un peso molecular de menos de 1000 Da. En algunas opciones, la fracción activa se caracteriza por tener una actividad biológica. En algunas realizaciones, la actividad biológica es una inhibición o disminución de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en al menos un 5 %, 10 % o preferentemente 15 % en comparación con un control o sustancia placebo cuando la fracción activa se incuba con suero normal durante 10 minutos. En algunas opciones, la actividad biológica es la inhibición de la agregación plaquetaria en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria. En algunas opciones, la inhibición de la agregación plaquetaria se expresa como porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria por un efector conocido de la agregación plaquetaria, por ejemplo, colágeno, ADP, o ácido araquidónico. En algunas opciones, la fracción activa de la presente invención inhibe la agregación plaquetaria por uno de estos efectores conocidos en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % con un máximo de aproximadamente 50 % o 60 % en comparación con un control o sustancia placebo.

Se ha encontrado que la fracción activa está principalmente asociada con, o se puede extraer, del zumo, de la pulpa que rodea las pepitas y de las pepitas del kiwi. De esta manera, el uso de composiciones preparadas a partir de una fracción activa que consiste esencialmente o que comprende un homogenado o un extracto del mismo procedente de la pulpa de un kiwi pelado o que consiste esencialmente en, o que comprende, el zumo y/o la pulpa que rodea las pepitas, y/o las pepitas, representa una realización preferida de la invención.

De acuerdo con ello, las realizaciones de la presente invención proporcionan una fracción activa de un extracto de kiwi con una o más de las siguientes características:

- a) el tamaño de las moléculas en la fracción activa es inferior a 1000 Da;
- b) la fracción activa es sustancialmente estable al calor;
- c) la fracción activa es sustancialmente incolora;
- d) la fracción activa comprende sustancialmente compuestos solubles en agua;
- e) la fracción activa inhibe la agregación plaquetaria; y
- f) la fracción activa inhibe la enzima convertidora de la angiotensina.

Las fracciones activas de la presente invención pueden proporcionarse de diversas formas y en diversas formulaciones. En algunas realizaciones, las fracciones se proporcionan en forma de líquido, un jarabe, un polvo, una pasta, una emulsión, una composición aglomerada, una composición granulada, una composición encapsulada, una suspensión, un concentrado, una solución, una pastilla para chupar. El polvo puede ser preferiblemente un polvo liofilizado, criocongelado o secado mediante pulverización preparado a partir del extracto de kiwi estabilizado con o sin excipiente organolépticamente y/o farmacéuticamente aceptable. El jarabe puede ser preferentemente una

solución acuosa viscosa concentrada preparada a partir del extracto de kiwi estabilizado y puede incluir excipientes y/o edulcorantes adecuados. Los jarabes pueden utilizarse para la administración oral directa o como concentrado para su reconstitución con agua antes de la administración.

5 Las fracciones pueden proporcionarse mediante cualquiera de numerosas vías, incluyendo, pero sin limitación, oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, bucal, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual o rectal. Los detalles sobre las técnicas de formulación para y la administración pueden encontrarse en la última edición del Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.).

10 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un vehículo de administración oral que comprende una fracción de la presente invención. Las fracciones pueden formularse preferentemente con transportadores farmacéuticamente aceptables tales como almidón, sacarosa o lactosa en comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, cápsulas gelificadas, soluciones, líquidos, lechadas, suspensiones y emulsiones. Los comprimidos o cápsulas de la presente invención pueden revestirse con un revestimiento entérico que se disuelve a un pH de aproximadamente 6,0 a 7,0. Un revestimiento entérico adecuado que se disuelve en el intestino delgado pero no en el estómago es el acetato ftalato de celulosa. En algunas realizaciones, el vehículo de administración oral comprende una cantidad del primer y el segundo componente eficaz para producir un efecto en un sujeto seleccionado entre el grupo que consiste en aumentar la eficacia de trabajo del músculo, disminuir el coste de energía del trabajo, aumentar el tiempo de trabajo hasta el agotamiento, aumentar la resistencia durante el ejercicio físico, aumentar el bienestar, mejorar el dolor muscular tras ejercicios extremos, mejorar las dolencias metabólicas en sujetos con obesidad y/u otro síndrome metabólico, y sus combinaciones. Los ejemplos de mejorar las dolencias metabólicas en sujetos con obesidad y/o síndrome metabólico incluyen, pero sin limitación, aumento de la captación de glucosa, disminución del estrés oxidativo, y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el vehículo de administración oral comprende una cantidad eficaz de las fracciones. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz comprende una cantidad de extracto que contiene los ingredientes biológicamente activos que se encuentran entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 kiwis, y preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 kiwis, y lo más preferente aproximadamente 1 a 5 kiwis. En otras realizaciones, la cantidad eficaz corresponde a aproximadamente 1 a aproximadamente 5000 mg de la fracción liofilizada o secada mediante pulverización, estabilizada, preferentemente entre aproximadamente 1 a aproximadamente 3000 mg de la fracción liofilizada o secada mediante pulverización, estabilizada y lo más preferente aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg de la fracción liofilizada o secada mediante pulverización, estabilizada. En otras realizaciones, la cantidad eficaz corresponde a aproximadamente 500 a aproximadamente 20000 mg de la fracción concentrada (por ejemplo, un jarabe), estabilizada, preferentemente entre aproximadamente 500 a aproximadamente 10000 mg de la fracción concentrada (por ejemplo, un jarabe), estabilizada y lo más preferente aproximadamente 500 mg a aproximadamente 2500 mg de la fracción concentrada (por ejemplo, un jarabe), estabilizada.

35 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona suplementos de la dieta que comprenden las fracciones de la presente invención. Los ingredientes del suplemento de la dieta de la presente invención están contenidos preferentemente en excipientes y/o transportadores aceptables para el consumo oral. La forma real del transportador y, de este modo, el propio suplemento de la dieta, no es crítica. El transportador puede ser un líquido, gel, cápsula gelificada, cápsula, polvo, comprimido sólido (revestido o no revestido), té, o similares. El suplemento de la dieta está preferentemente en la forma de un comprimido o cápsula y lo más preferente en la forma de una cápsula de gelatina blanda. En otras realizaciones, el suplemento se proporciona como un polvo o líquido adecuado para que el consumidor lo añada a un alimento o bebida. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el suplemento de la dieta puede administrarse a un individuo en la forma de polvo, por ejemplo, para utilizarse mezclado en una bebida, o mediante agitación en un alimento semisólido tal como un pudín, cobertura, salsa, puré, cereal cocinado, o aderezo para ensalada, por ejemplo, o añadido de otra forma a un alimento. En realizaciones preferidas, los suplementos de la dieta comprenden una cantidad eficaz de los componentes que se han descrito anteriormente.

50 El suplemento de la dieta puede comprender uno o más ingredientes inertes, especialmente si es deseable limitar el número de calorías añadidas a la dieta por el suplemento de la dieta. Por ejemplo, el suplemento de la dieta de la presente invención puede contener también ingredientes opcionales que incluyen, por ejemplo, hierbas, vitaminas, minerales, potenciadores, colorantes, edulcorantes, aromatizantes, ingredientes inertes, y similares. Por ejemplo, el suplemento de la dieta de la presente invención puede contener uno o más de los siguientes: ascorbatos (ácido ascórbico, sales minerales de ascorbato, escaramujo, acerola, y similares), deshidroepiandrosterona (DHEA), té verde (polifenoles), inositol, quelpo, dulce, bioflavinoídes, maltodextrina, ortigas, niacina, niacinamida, romero, selenio, sílice (dióxido de silicio, gel de sílice, cola de caballo, equiseto, y similares), espirulina, cinc, ácido docosahexanoico y/o ácido eicosapentanoico (proporcionado en cualquier forma tal como ácidos grasos libres, triglicéridos o fosfolípidos) y similares. Dichos ingredientes opcionales pueden tanto producirse naturalmente como en formas concentradas.

60 En algunas realizaciones, los suplementos de la dieta comprenden además vitaminas y minerales que incluyen, pero sin limitación, fosfato o acetato de calcio, tribásico; fosfato de potasio, dibásico; sulfato u óxido de magnesio; sal (cloruro de sodio); cloruro o acetato de potasio; ácido ascórbico; orfosfato férrico; niacinamida; sulfato u óxido de cinc; pantotenato de calcio; gluconato de cobre; riboflavina; beta-caroteno; clorhidrato de piridoxina; mononitrato de tiamina; ácido fólico; biotina; cloruro o picolonato de cromo; yoduro de potasio; selenato de sodio; molibdato de

sodio; filoquinona; vitamina D3; cianocobalamina; selenito de sodio; sulfato de cobre; vitamina A; vitamina C; inositol; yoduro de potasio. Se pueden obtener dosificaciones adecuadas para vitaminas y minerales, por ejemplo, consultando las directrices de la U.S. RDA.

5 En realizaciones preferidas, los suplementos de la dieta comprenden una cantidad eficaz de las fracciones que se han descrito anteriormente. Los suplementos de la dieta de la presente invención se pueden tomar una o más veces al día. Preferentemente, el suplemento de la dieta se administra una o dos veces al día por vía oral. La frecuencia de administración dependerá, por supuesto, de la dosis por unidad (cápsula o comprimido) y del nivel deseado de ingestión. Los niveles/unidad de la dosis se pueden ajustar para proporcionar los niveles recomendados de ingredientes por día (por ejemplo, una cantidad eficaz como se ha descrito anteriormente) en un número razonable de unidades (por ejemplo, dos cápsulas o comprimidos tomados dos veces al día). En realizaciones preferidas, las dosis se añaden diariamente hasta la ingesta diaria de cada ingrediente. En realizaciones preferidas, los suplementos de la dieta se toman con la comida o antes de las comidas. En otras realizaciones, los suplementos de la dieta no se toman con comidas.

15 En otras realizaciones, la presente invención proporciona suplementos nutritivos (por ejemplo, barras energéticas o barras sustitutivas de comidas o bebidas) que comprenden las fracciones de la presente invención. En realizaciones preferidas, los suplementos nutritivos comprenden una cantidad eficaz de los componentes que se han descrito anteriormente. El suplemento nutritivo puede servir como comida o aperitivo de sustitución y generalmente proporcionan calorías nutritivas. Preferentemente, los suplementos nutritivos proporcionan hidratos de carbono, proteínas, y grasas en cantidades equilibradas. El suplemento nutritivo puede comprender además hidratos de carbono simples, de longitud de cadena media, o polisacáridos, o una de sus combinaciones. Puede seleccionarse un azúcar sencillo para conseguir las propiedades organolépticas deseadas. El almidón de maíz sin cocinar es un ejemplo de un hidrato de carbono complejo. Si se desea que mantenga su estructura de elevado peso molecular, debe incluirse solamente en formulaciones alimenticias o partes de las mismas que no se cocinen o procesen térmicamente debido a que el calor descompondrá el hidrato de carbono complejo en hidratos de carbono sencillos, en el que los hidratos de carbono sencillos son monosacáridos o disacáridos. Los suplementos nutritivos contienen, en una realización, combinaciones de fuentes de hidratos de carbono de tres niveles de longitud de cadena (sencilla, media y compleja; por ejemplo, sacarosa, maltodextrinas, y almidón de maíz sin cocinar).

20 Las fuentes de proteínas que se van a incorporar en el suplemento nutritivo de la invención pueden ser cualquier proteína adecuada utilizada en las formulaciones nutritivas y pueden incluir proteína de suero lácteo, concentrado de proteína de leche, polvo de suero, huevo, harina de soja, proteína de leche de soja, aislado de proteínas de soja, caseinato (por ejemplo, caseinato sódico, caseinato sódico cálcico, caseinato cálcico, caseinato de potasio), proteína animal y vegetal y sus mezclas. Cuando se selecciona una fuente de proteínas, debe considerarse en primer lugar el valor biológico de la proteína, siendo los valores biológicos más elevados los del caseinato, suero de leche, lactoalbúmina, albúmina de huevo y proteínas de huevo completas. En una realización preferida, la proteína es una combinación del concentrado de proteína de suero y caseinato de calcio. Estas proteínas tienen un alto valor biológico; es decir, tienen una elevada proporción de aminoácidos esenciales. Véase *Modern Nutrition in Health and Disease*, octava edición, Lea & Febiger, editores, 1986, especialmente el Volumen 1, páginas 30-32.

30 El suplemento nutritivo puede incluir también otros ingredientes, tal como una o una combinación de otras vitaminas, minerales, antioxidantes, fibra y otros suplementos de la dieta (por ejemplo, proteína, aminoácidos, colina, lecitina, otros ácidos grasos). La selección de uno o varios de estos ingredientes es un tema de formulación, diseño, preferencias del consumidor y del usuario final. El experto en la técnica puede conocer con facilidad las cantidades de estos ingredientes añadidas a los suplementos de la dieta de la presente invención. Se puede proporcionar la directriz para dichas cantidades por las dosis indicadas en la U.S. RDA para niños y adultos. Las vitaminas y minerales adicionales que se pueden añadir incluyen, pero sin limitación, fosfato o acetato de calcio, tribásico; fosfato de potasio, dibásico; sulfato u óxido de magnesio; sal (cloruro de sodio); cloruro o acetato de potasio; ácido ascórbico; orfosfato férrico; niacinamida; sulfato u óxido de cinc; pantotenato de calcio; gluconato de cobre; riboflavina; beta-caroteno; clorhidrato de piridoxina; mononitrato de tiamina; ácido fólico; biotina; cloruro o picolonato de cromo; yoduro de potasio; selenato de sodio; molibdato de sodio; filoquinona; vitamina D₃; cianocobalamina; selenito de sodio; sulfato de cobre; vitamina A; vitamina C; inositol; yoduro de potasio.

40 Se pueden incorporar al producto aromas, agentes colorantes, especias, y frutos secos. Los aromatizantes pueden estar en la forma de extractos aromatizados, aceites volátiles, aromas de chocolate, aroma de mantequilla de cacahuete, migas de galleta, arroz crujiente, vainilla o cualquier aroma comercialmente disponible. Los ejemplos de aromas útiles incluyen, pero sin limitación, extracto puro de anís, extracto de imitación a banana, extracto de imitación a cereza, extracto de chocolate, extracto puro de limón, extracto puro de naranja, extracto puro de menta piperita, extracto de imitación a piña, extracto de imitación a ron, extracto de imitación a fresa, extracto puro de vainilla; o aceites volátiles, tales como aceite de bálsamo, aceite de laurel, aceite de bergamota, aceite de madera de cedro, aceite de avellana, aceite de cereza, aceite de canela, aceite de clavo, o aceite de menta piperita; mantequilla de cacahuete, aroma de chocolate, migas de galleta de vainilla, azúcar y mantequilla o tofe. En una realización, el suplemento de la dieta contiene cacao o chocolate.

50 Pueden añadirse emulsionantes para estabilizar el producto final. Los ejemplos de emulsionantes adecuados incluyen, pero sin limitación, lecitina (por ejemplo, de huevo o soja), y/o monoglicéridos y diglicéridos. Otros

emulsionantes son fácilmente obvios para los expertos en la materia y la selección del emulsionante (o emulsionantes) adecuado(s) dependerá, en parte, de la formulación y del producto final.

5 Pueden añadirse también conservantes al suplemento nutritivo para extender la vida media del producto. Preferentemente, se usan conservantes tales como sorbato de potasio, sorbato de sodio, benzoato de potasio, benzoato de sodio o EDTA de calcio disodio.

10 Además de los hidratos de carbono descritos anteriormente, el suplemento nutritivo puede contener edulcorantes naturales o artificiales (preferentemente de calorías bajas), por ejemplo, sacáridos, ciclamatos, aspartamina, aspartame, acesulfame K, y/o sorbitol. Dichos edulcorantes artificiales pueden ser deseables si se pretende que el suplemento nutritivo se consuma por un individuo con sobrepeso u obeso, o un individuo con diabetes de tipo II que es propenso a hiperglicemia.

15 El suplemento nutritivo puede proporcionarse en una variedad de formas, y mediante una variedad de procedimientos de producción. En una realización preferida, para fabricar una barrita saludable, se cocinan los ingredientes líquidos; se añaden los ingredientes secos con los ingredientes líquidos en un mezclador y se mezclan hasta que se alcanza la fase masa; la masa se coloca en una extrusora, y se extrude; la masa extrudida se corta en longitudes adecuadas; y el producto se enfría. Las barritas pueden contener otros nutrientes y cargas para potenciar el sabor, además de los ingredientes específicamente citados en el presente documento.

20 En otras realizaciones adicionales, la presente invención proporciona productos alimenticios, productos alimenticios preparados, o comestibles que comprenden los extractos o fracciones descritos anteriormente (es decir, alimentos funcionales). En realizaciones preferidas, los alimentos comprenden una cantidad eficaz de las fracciones que se han descrito anteriormente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporcionan bebidas y alimentos sólidos o semisólidos que comprenden los extractos, fracciones o derivados de los mismos. Estas formas pueden incluir, pero sin limitación, bebidas (por ejemplo, bebidas sin alcohol, leche y otras bebidas lácteas, y bebidas de dieta), productos horneados, púdines, productos de leche fresca, productos de confitería, aperitivos, productos de confitería congelados o innovaciones (por ejemplo, helados, batidos de leche), alimentos congelados preparados, golosinas, productos de aperitivo (por ejemplo, patatas chips), sopas, pastas para untar, salsas, aderezos para ensaladas, productos cárnicos preparados, queso, y yogur.

PARTE EXPERIMENTAL

Se proporcionan los siguientes ejemplos para demostrar e ilustrar adicionalmente determinadas realizaciones y aspectos preferidos de la presente invención y no deben tomarse como limitantes de su alcance.

30 Ejemplo 1

Preparación de extracto de kiwi:

35 Se preparó un extracto consistente en zumo de kiwi al 100 %. Para preparar zumo de fruta al 100 %, las frutas se pelaron y se homogeneizó la pulpa. El homogenado resultante se centrifugó a 9000xg durante 15 min a 4 °C en una centrífuga, tras lo cual se eliminó el sobrenadante y se ajustó el pH del zumo a 7,4 con una solución de hidróxido de sodio 1 M. Se determinó inicialmente la actividad antiplaquetaria del extracto de kiwi (EK).

Fraccionamiento parcial del extracto de kiwi:

40 A continuación se fraccionaron los extractos de kiwi de acuerdo con el esquema general que se muestra en la Figura 1. Se midió la actividad de inhibición de la agregación plaquetaria de las preparaciones en diversas etapas. De esta manera, el zumo de kiwi fresco, preparado a partir de un 100 % de fruta, se centrifugó a 9000xg durante 10 min. Tras la centrifugación, el sobrenadante se criodesecó y una parte del material seco se disolvió en tampón fosfato y se ajustó el pH a 7,4. Este se sometió a continuación a ultrafiltración pasándolo a través de un filtro con un corte de pesos moleculares de 1000 Dalton. Se recogió el ultrafiltrado, y se criodesecó y se reconstituyó con agua, y se ajustó el pH a 7,4. Se midió la agregación plaquetaria utilizando el extracto en diferentes etapas del fraccionamiento. En un estudio independiente, se hirvió el extracto durante 10 min, y se centrifugó, y se determinó la actividad antiplaquetaria de la muestra hervida.

45 Para examinar si los compuestos lipídicos en los extractos fraccionados eran responsables de la actividad antiplaquetaria, los lípidos del extracto se eliminaron haciendo pasar la solución a través de la columna Lipidex-1000 preparada especialmente (volumen de columna 18 ml). Lipidex-1000 adsorbe solamente las sustancias lipídicas del extracto. A continuación se eluyó la columna con 5 volúmenes de columna de tampón fosfato 15 mM, y la solución eluda se recogió y se secó. Los compuestos lipídicos que se encontraban en la resina de la columna se eluyeron posteriormente con solución metanólica y se secaron para la medida de la actividad antiplaquetaria. Además del experimento anterior con Lipidex-1000, los lípidos también se eliminaron con otro procedimiento utilizando cloroformo y metanol de acuerdo con Bligh y Dyer. De esta manera, 2 ml del ultrafiltrado se mezclaron con 2,5 ml de metanol seguido por 1,25 ml de cloroformo para dar una única fase, y una relación de cloroformo:metanol:agua de 1.2:0.8. No se formó precipitado. A continuación se añadieron cloroformo (1,25 ml) y agua (1,25 ml) y, tras agitar suavemente, la mezcla se dejó sedimentar en dos capas. La capa superior (metanol/agua) se eliminó y se sopló

metanol bajo atmósfera de nitrógeno a 55 °C. A continuación se completó el volumen a 2 ml tras ajuste a pH 7,4. La actividad antiplaquetaria de esta fase acuosa se comparó con el volumen respectivo de tampón fosfato como un control.

5 A continuación se evaporó la fase del cloroformo con nitrógeno, y se volvió a suspender en etanol (50 µl). A continuación se ensayó una muestra de la fase etanol (10 µl) para la actividad de la agregación antiplaquetaria frente a 10 µl de etanol del control.

Estudio de agregación plaquetaria:

10 Se investigó el efecto de los extractos de fruta sobre las propiedades de agregación de las plaquetas humanas en voluntarios sanos. Se recogió sangre venosa de voluntarios que no habían tomado ninguna medicación durante al menos 14 días antes de la donación. Se extrajo sangre (20 ml) utilizando una aguja de tipo mariposa 19G y se evitó la coagulación mezclando las muestras de sangre con citrato ácido, (135 mM) con una relación de 9 partes por volumen de sangre hasta 1 parte por volumen de citrato ácido. Se preparó plasma rico en plaquetas (PRP) procedente de las muestras centrifugando la muestra a 180xg de 15 min. Un zumo de kiwi (10-30 µl), cuyo pH se había ajustado a 7,4 con hidróxido de sodio 1 M, se mezcló con el PRP para preparar un volumen de hasta 500 µl, y se incubó a 37 °C durante 15 min, tras lo cual se controló el efecto del extracto de fruta sobre la agregación plaquetaria inducida por el ADP con la adición de ADP hasta una concentración final de 5 µM. Los controles se analizaron en paralelo utilizando 10-30 µl de tampón fosfato, pH 7,4 en vez del extracto de fruta. Se controló la agregación plaquetaria en PRP utilizando una agregación Chrono-Log (Chrono-Log, EE.UU.) a una velocidad de agitación constante de 1000 rpm a 37 °C.

20 Para determinar el efecto del EK sobre la agregación plaquetaria *in vitro*, se incubó PRP (450 µl) con diferentes concentraciones del EK (50 µl en volumen durante 15 min a 37 °C antes de la adición de un agente de agregación. Se determinó la CI_{50} de diferentes fracciones de EK incubando estas plaquetas con diferentes concentraciones de EK durante 15 min. Se analizaron los controles en paralelo sustituyendo el extracto de fruta con 50 µl de fosfato. La inhibición de la agregación plaquetaria se expresa como la disminución en el área bajo la curva en comparación con el control.

Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) por el Extracto de Kiwi:

30 La enzima convertidora de la angiotensina 1 (ACE, EC 3.4.15.1), una exopeptidasa, es una enzima en circulación que participa en el sistema renina-angiotensina del organismo, que media en el volumen extracelular (por ejemplo, el del plasma sanguíneo, el fluido linfático e intersticial), y la vasoconstricción arterial. Se secreta por las células endoteliales pulmonares y renales y cataliza la conversión del decapeptido angiotensina I al octapéptido angiotensina II. Los inhibidores de ACE bloquean la conversión de la angiotensina I a angiotensina II. Disminuyen por tanto la resistencia arteriolar y aumentan la capacidad venosa; aumentan el gasto cardiaco y el índice cardiaco, el trabajo y el volumen del latido, disminuyen la resistencia renovascular, y conducen a un aumento de la natriuresis (excreción de sodio en la orina). Con el uso de los inhibidores de ACE se evitan los efectos de la angiotensina II, que ocasionan una disminución de la presión sanguínea. Se midió el efecto del EK sobre la actividad de la ACE en suero utilizando el kit de ensayo de la enzima convertidora de la angiotensina de BÜHLMANN LABORATORIES AG, Alemania.

Resultados:

40 *Fraccionamiento de extractos de fruta de kiwi y sus efectos sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP mediante ADP.*

La **Figura 1** muestra la preparación de extracto de kiwi utilizando diferentes procedimientos de fraccionamiento. El(los) inhibidor(es) de la agregación plaquetaria en extractos de kiwi estaban presentes en la fracción soluble en agua y su tamaño es menor de 1000 daltons. La ebullición de esta fracción no destruye la actividad. La deslipidación de la muestra mediante Lipidex-1000 ha demostrado que la fracción activa está presente en el extracto acuoso.

45 *Estudios de agregación plaquetaria*

La **Tabla 1** muestra la respuesta a la dosis del extracto de kiwi sobre la inhibición de la agregación plaquetaria por diferentes agentes. Esto demuestra un efecto de respuesta a la dosis con la agregación inducida por ADP: el aumento del extracto de kiwi condujo a una reducción mayor en la agregación plaquetaria. La fracción aislada de kiwi fue igualmente eficaz frente a tres agentes de agregación plaquetaria, colágeno, ADP, y ácido araquidónico.

50 La Figura 2 muestra el efecto de diferentes volúmenes de extracto de kiwi sobre la agregación plaquetaria o ADP *in vitro*. Se incubó PRP (450 µl) con diferentes volúmenes (0, 10, 20 y 30 µl) de EK durante 15 min a 37° C antes de la adición de agonistas, ácido araquidónico (500 µg/ml), ADP (3 mM, y colágeno (1 µg/ml). El EK inhibió la agregación inducida por ADP de una manera dependiente de la dosis (Tabla 1). ADP indujo la agregación se inhibió en un 45 % con 10 µl de EK, 65 % con 20 µl de EK, y 95 % con 30 µl de EK, en comparación con los controles. De manera similar, el EK inhibió la agregación plaquetaria inducida por colágeno; el nivel de inhibición fue menor con incubaciones de 10 y 20 µl. La inhibición de la agregación plaquetaria inducida por ácido presentó un 38 % de

inhibición al nivel de EK más elevado ensayado y muy poca inhibición a concentraciones menores de EK.

Tabla 1:

Volumen del extracto de kiwi (µl)	Inhibición de la agregación plaquetaria por tres agonistas diferentes (promedio en %)		
	Ácido araquidónico	Colágeno	ADP
10	12	18	45
20	25	45	65
30	38	90	95

La ebullición del extracto de kiwi a 100° C durante 10 min no afecta a la agregación plaquetaria del extracto.

- 5 *Determinación del efecto del EK sobre la agregación plaquetaria inducida por diferentes agonistas.* Las Figuras 2 y 3 muestran la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico, colágeno y ADP, respectivamente. Se describen las condiciones experimentales en la Tabla 1.

- 10 *Determinación del efecto del extracto de kiwi fraccionado sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP.* La Figura 4 muestra el efecto del extracto de kiwi fraccionado sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP. Se describen las condiciones experimentales en la Tabla 1. El extracto de EK se purificó como se describe en la Fig. 1.

Efectos del EK sobre la actividad de ACE en el suero humano. La incubación del suero con 20 µl de EK durante 15 min inhibió más del 15 % de actividad en comparación con el control.

La Figura 5 muestra el barrido de UV de las fracciones activas deslipidizadas ultrafiltradas purificadas del extracto de kiwi.

15 **Ejemplo 2**

Se preparó zumo de kiwi tras la homogeneización de las frutas peladas, posteriormente se centrifugó a 9000xg durante 15 min y se mantuvo a 4 °C para el ensayo de antiplaquetas. La otra fracción del zumo se hizo ebullición a 90 °C durante 20 min y se centrifugó de nuevo, y se ajustó el pH a 7,4 y se mantuvo a 4 °C un máximo de 24 días.

- 20 Se midió la actividad inhibidora del zumo de kiwi y el extracto en diferentes días como se ha indicado en la tabla y se midió su actividad antiplaquetaria incubando el PRP con el zumo (tras ajustar el pH a 7,4) o el extracto durante 15 minutos, y se comparó su inhibición con la del control (en ausencia de zumo o extracto) utilizando 3 µM de ADP como agente de agregación.

Día	Zumo de kiwi	Extracto de kiwi
	Actividad inhibidora	Actividad
Día 0	100	100
Día 4	76	100
Día 18	29	100
Día 24	4	100

- 25 **Conclusión:** El zumo pierde un 24 % de actividad en una semana y un 70 % después de 18 días, mientras que el extracto hervido retiene un 100 % su actividad. El extracto criodesecado retuvo también su actividad.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe los espectros de UV y EM del extracto de kiwi soluble en agua y estable térmicamente muy purificado que contiene actividad antiplaquetaria.

- 30 Se preparó el zumo de kiwi y se clarificó el zumo mediante centrifugación a 9000 g durante 15 min. A continuación se hizo ebullición el sobrenadante a 90 °C durante 20 min. El extracto enfriado se centrifugó de nuevo a continuación a 9000xg durante 15 min. A continuación se pasó el sobrenadante incoloro a través de una columna LIPDEX-1000 para eliminar cualquier lípido asociado. La muestra deslipidizada eluida se criodesecó a continuación y se pasó a través de un filtro de corte molecular de 1000 Dalton. El filtrado se analizó en una CL-EM/EM-UV de etapa triple. Barridos de EM de 100-1000 Pm en modo negativo (Figura 7) y espectro de UV a 200-400 nm (Figura 6).

35

La columna es una columna C18 Zorbax de 1,8 µM de resolución rápida de partículas (4,6 mm x 50 mm, 1,8 µm). La elución se llevó a cabo comenzando con un 100 % de fase móvil (A) agua- ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) a 100 % de B acetonitrilo-ácido fórmico (100:0,1, v/v/v) durante 35 minutos.

Ejemplo 4

5 Se preparó zumo de kiwi tras la homogeneización de las frutas peladas, posteriormente se centrifugó a 9000xg durante 15 min y se mantuvo a 4 °C para el ensayo de antiplaquetas. La otra fracción del zumo se hizo ebullición a 90° C durante 20 min y se centrifugó de nuevo, y se ajustó el pH a 7,4 y se mantuvo a 4 °C y se mantuvo hasta 24 días. Se midieron la actividad antiplaquetaria del zumo y el extracto en diferentes días, incubando el PRP con el zumo (tras ajustar el pH a 7,4) o el extracto durante 15 minutos, y se comparó su inhibición con la del control (en ausencia de zumo o extracto) utilizando 3 µM de ADP como agente de agregación.

Día	Actividad inhibitora del zumo de kiwi	Actividad del extracto de kiwi
Día 0	100	100
Día 4	76	100
Día 18	29	100
Día 24	4	100

Conclusión: El zumo pierde un 24 % de actividad en una semana y un 70 % después de 18 días, mientras que el extracto hervido retiene un 100 % su actividad. El extracto criodesecado retuvo toda su actividad.

Ejemplo 5

15 Se preparó el extracto de kiwi como se ha descrito anteriormente. El rendimiento de la preparación final fue de 4-5 g por 100 g de frutas y contenía un 45-50 % de azúcar. Los datos aquí presentados utilizaron el extracto preparado en Trondheim. Se mezclaron 20 g de EK con 200 ml de zumo Tine Milk Orange para consumo. Se reclutaron en el estudio seis adultos sanos de ambos sexos. Los sujetos tenían edades comprendidas entre 25-60 y no tenían antecedentes de enfermedad o trastornos hemostáticos importantes. Se evaluó su adecuación para la inclusión en el estudio utilizando cuestionarios sobre la dieta y el estilo de vida y mediante cribado médico, durante el cual se evaluó la función plaquetaria. Los sujetos se seleccionaron sobre la base de una función plaquetaria elevada, determinado mediante la respuesta de agregación plaquetaria a 3 µmol ADP/l. Se pidió a los sujetos que consumían habitualmente suplementos de la dieta (por ejemplo, aceites de pescado) que suspendieran estos suplementos durante un mínimo de 1 mes antes de participar en el estudio. Se pidió a los sujetos que se abstuvieran de tomar fármacos conocidos por afectar la función plaquetaria durante un periodo de 10 d antes de su participación. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos por escrito. Este estudio fue autorizado por la autoridad de Oslo. Se hizo ayunar a los voluntarios durante la noche. Se extrajeron muestras de sangre venosa de ~20 ml en cada punto temporal de muestreo (tiempo 0) y a continuación se pidió a los voluntarios que bebieran 200 ml de zumo de naranja que contenía 20 g de EK. Para las medidas de la función plaquetaria se extrajo sangre en jeringuillas de plástico que se transfirió a tubos de extracción de sangre citrados (concentración final de citrato de sodio, 13 mmol/l).

25 Estudios de agregación plaquetaria ex vivo. Se llevó a cabo la medida de la extensión de la agregación plaquetaria inducida por ADP en PRP en cada punto temporal. La respuesta plaquetaria a concentraciones subóptimas de ADP fue también de interés; en estas condiciones, se puede observar una respuesta de agregación bifásica, que proporciona información adicional acerca de la naturaleza de la respuesta plaquetaria. Se usó una concentración estandarizada r de ADP (3 µmol/l) para todas las medidas. Para los estudios ex vivo, los efectos sobre la agregación plaquetaria observados tras las intervenciones de tratamiento o control se expresan como porcentaje de variación del área bajo la curva de agregación tras el consumo de extracto o placebo, en comparación con los valores iniciales.

Los resultados se expresan aquí como % de inhibición

Voluntarios	% de inhibición tras 2 horas
1	8,1
2	12,6
3	12
4	15
5	8,2

Referencias:

1. Dutta-Roy AK. (2002) Dietary components and human platelet activity. Platelets. 13(2):67-75
 2. Dutta-Roy, AK, Crossbi, L, y Gordon, M.J. (2001) Effects of tomato extract on human platelet aggregation in

vitro, Platelets, 12(4):218-27.

3. Nishiyama I. Fruits of the actinidia genus. Adv Food Nutr Res. 2007;52:293-324.

4. Sun-Waterhouse D, Chen J, Chuah C, Wibisono R, Melton LD, Laing W, Ferguson LR, Skinner MA (2009). Kiwifruit-based polyphenols and related antioxidants for functional foods: kiwifruit extract-enhanced gluten-free bread. Int J Food Sci Nutr. 60 Suppl. 7:251-64. Publicación electrónica:

5 Daigo Abe, Takeshi Saito, Yasutaka Kubo, Yoshimasa Nakamura, Keizo Sekiya A fraction of unripe kiwi fruit extract regulates adipocyte differentiation and function in 3T3-L1 cells, Biofactor vol.

6. Duttaroy, AK, y Jorgensen A.J. (2004) Effects of kiwi fruit consumption on platelet aggregation and plasma lipids in healthy human volunteers. Platelets 15, 287-292 13(2):67-75

10

REIVINDICACIONES

1. Fracción activa de un extracto de kiwi, siendo el tamaño de las moléculas en la fracción activa inferior a 1000 daltons y en el que dicha fracción inhibe la agregación plaquetaria e inhibe la enzima convertidora de la angiotensina.
- 5 2. Fracción de la reivindicación 1, en la que dicha fracción inhibe la agregación plaquetaria en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria e inhibe la enzima convertidora de la angiotensina en un ensayo *in vitro* de la enzima convertidora de la angiotensina.
- 10 3. Fracción de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha fracción activa se caracteriza por ser estable y retener al menos un 80 % de la inhibición de la agregación plaquetaria en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria cuando se almacena durante 4 días a 4 °C en comparación con un extracto de kiwi sin fraccionar.
4. Fracción de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la fracción activa tiene más de un 4 % de actividad inhibidora en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria tras mantenerse a 4 °C durante 24 días normalizado al día 0.
- 15 5. Fracción de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho extracto de fruta presenta máximos principales a aproximadamente 1,30 y 1,81 minutos en un barrido de espectro de UV de una cromatografía líquida de dicho extracto en una columna C18 Zorbax de 1,8 µm con una resolución rápida de partículas de 4,6 mm x 50 mm con un 100 % de fase móvil A de agua: ácido fórmico en una relación volumétrica de 100 : 0,1 a 100 % de B acetonitrilo : ácido fórmico en una relación volumétrica de 100 : 0,1 durante 35 minutos.
- 20 6. Fracción de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho extracto de fruta presenta máximos principales a aproximadamente 1,61, 30,18, y 30,87 en una espectrometría de masas 100-1000 Pm en un barrido en modo negativo de una cromatografía líquida de dicho extracto en una columna C18 Zorbax de 1,8 µm de resolución rápida de partículas de 4,6 mm x 50 mm con un 100 % de fase móvil A de agua: ácido fórmico en una relación volumétrica de 100 : 0,1 a 100 % de B acetonitrilo : ácido fórmico en una relación volumétrica de 100 : 0,1 durante 35 minutos.
- 25 7. Una composición que comprende la fracción de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, siendo dicha composición preferentemente un jarabe, solución o polvo.
8. Fracción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o composición de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de una patología iniciada o **caracterizada por** la activación y/o la agregación plaquetaria o para su uso en la reducción de la presión sanguínea.
- 30 9. Fracción para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la patología iniciada o **caracterizada por** la activación y/o la agregación plaquetaria se selecciona entre el grupo que consiste en trombosis, arterosclerosis y/o formación de placa.
- 35 10. El vehículo de administración oral o un suplemento nutritivo o un alimento o comestible funcional que comprende la fracción, composición, jarabe, solución o polvo de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, seleccionándose preferentemente dicho alimento o comestible entre el grupo que consiste en bebidas, productos horneados, púdines, productos de leche fresca, productos de confitería, alimentos tipo aperitivo, productos de confitería congelados o innovaciones, alimentos congelados preparados, golosinas, productos tipo aperitivo, sopas, pastas para untar, salsas, aderezos para ensaladas, productos cárnicos preparados, queso, y yogur, seleccionándose dicho suplemento nutritivo preferentemente entre el grupo que consiste en cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, cápsulas masticables, barritas saludables y polvos de suplemento.
- 40 11. Fracción, composición, jarabe, polvo, vehículo de administración oral o suplemento nutritivo, alimento o comestible funcional de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10 para su uso en la prevención o el tratamiento de una patología iniciada o **caracterizada por** la activación plaquetaria y/o la agregación o presión sanguínea elevada.
- 45 12. Procedimiento para producir una fracción de extracto de *Actinidia estable* y biológicamente activa que comprende las etapas de:
 - producir un extracto de *Actinidia*,
 - calentar el extracto de *Actinidia* en condiciones tales que el extracto retenga la actividad biológica durante el almacenamiento, y
 - 50 - procesar el extracto mediante ultrafiltración bien antes o después del calentamiento, en el que la ultrafiltración tiene un corte de 1000 Daltons, reteniendo dicha fracción activa al menos un 80 % de la de la inhibición de la agregación plaquetaria en un ensayo *in vitro* de agregación plaquetaria cuando se almacena durante 4 días a 4 °C en comparación con el extracto de kiwi sin fraccionar.

13. Procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicho calentamiento comprende calentar dicha fracción de 70 °C a 100 °C durante más de cinco minutos.

5 14. Procedimiento de las reivindicaciones 12 o 13, en el que dicho extracto de *Actinidia* se produce haciendo sedimentar un zumo u homogenado de *Actinidia* bien antes o después de calentar para proporcionar una fracción de sedimento y una fracción de sobrenadante, y retener dicha fracción de sobrenadante para proporcionar dicho extracto de *Actinidia* biológicamente activo.

15. Procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicha sedimentación comprende una centrifugación a al menos 3000 g.

FIG. 2

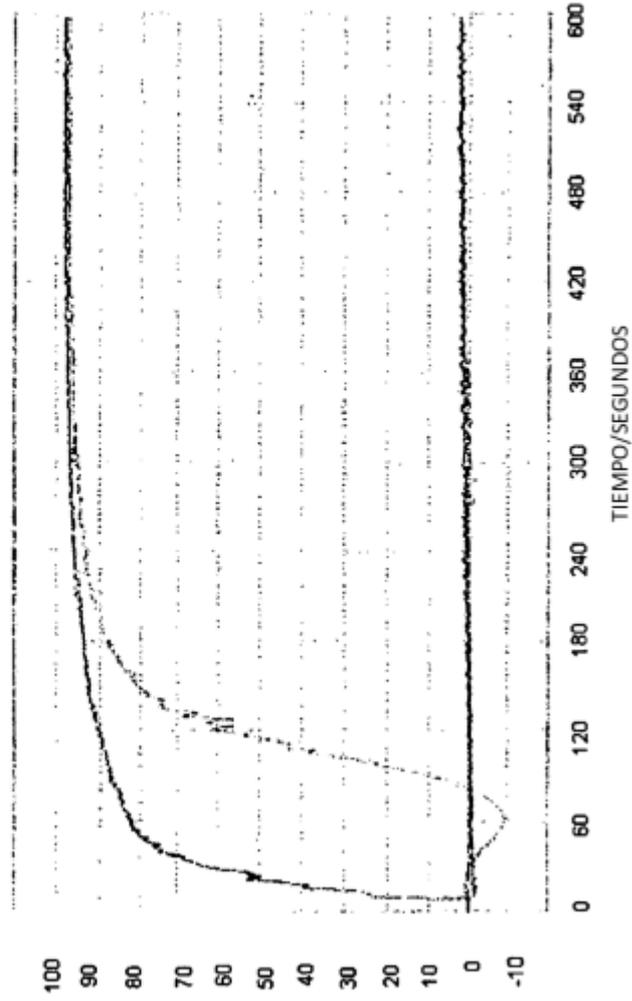
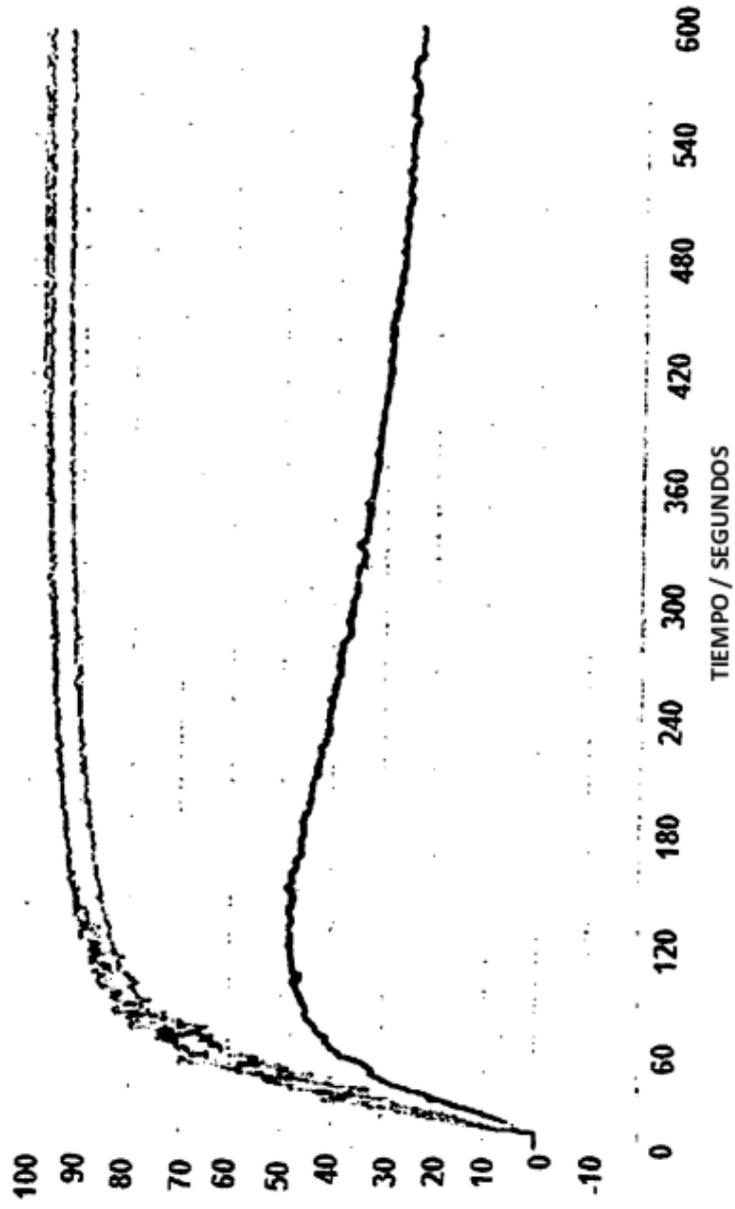


FIG. 3



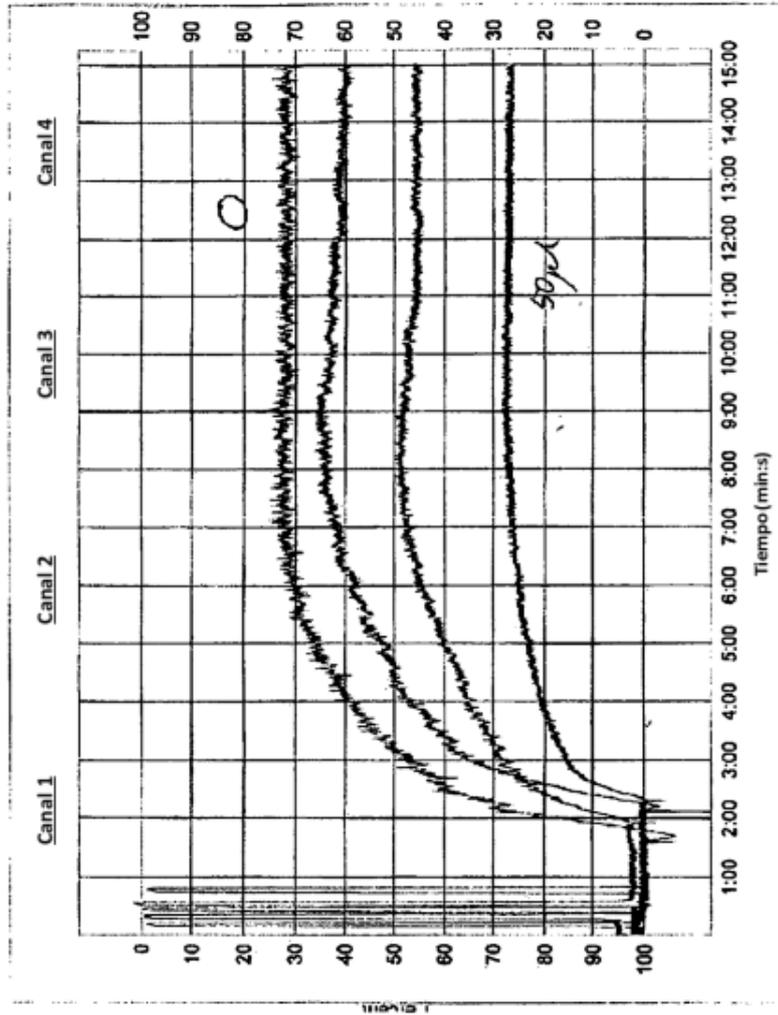


FIG. 4

FIG. 5

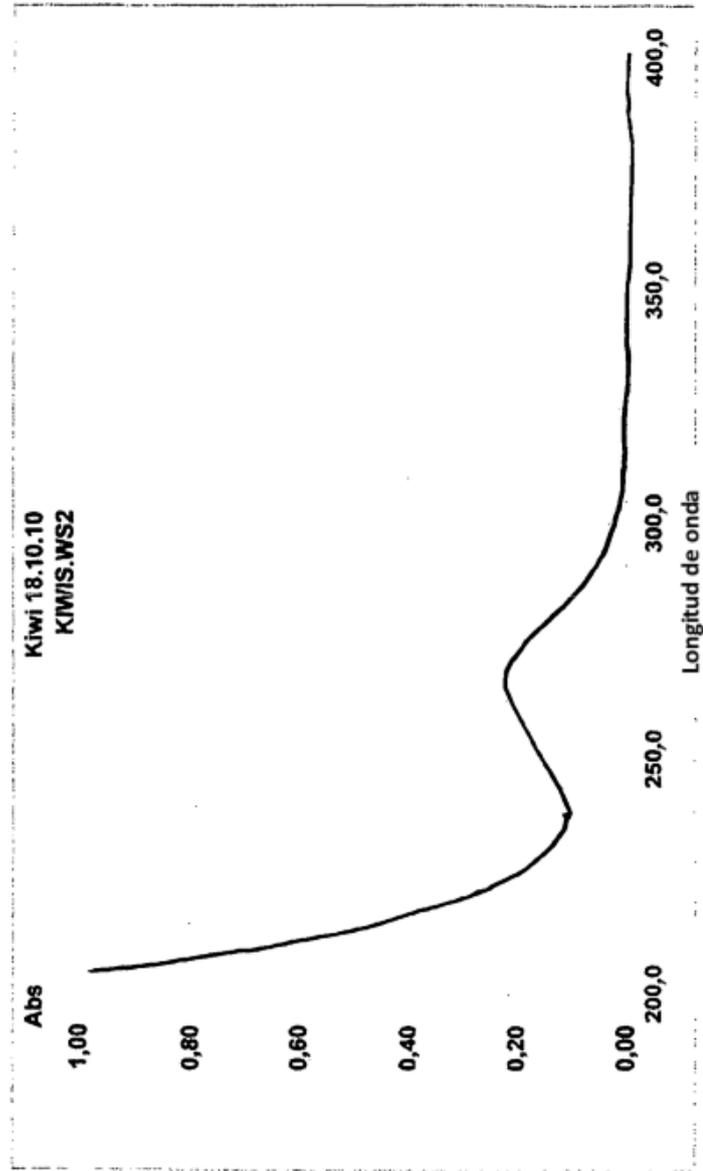


Figura 6

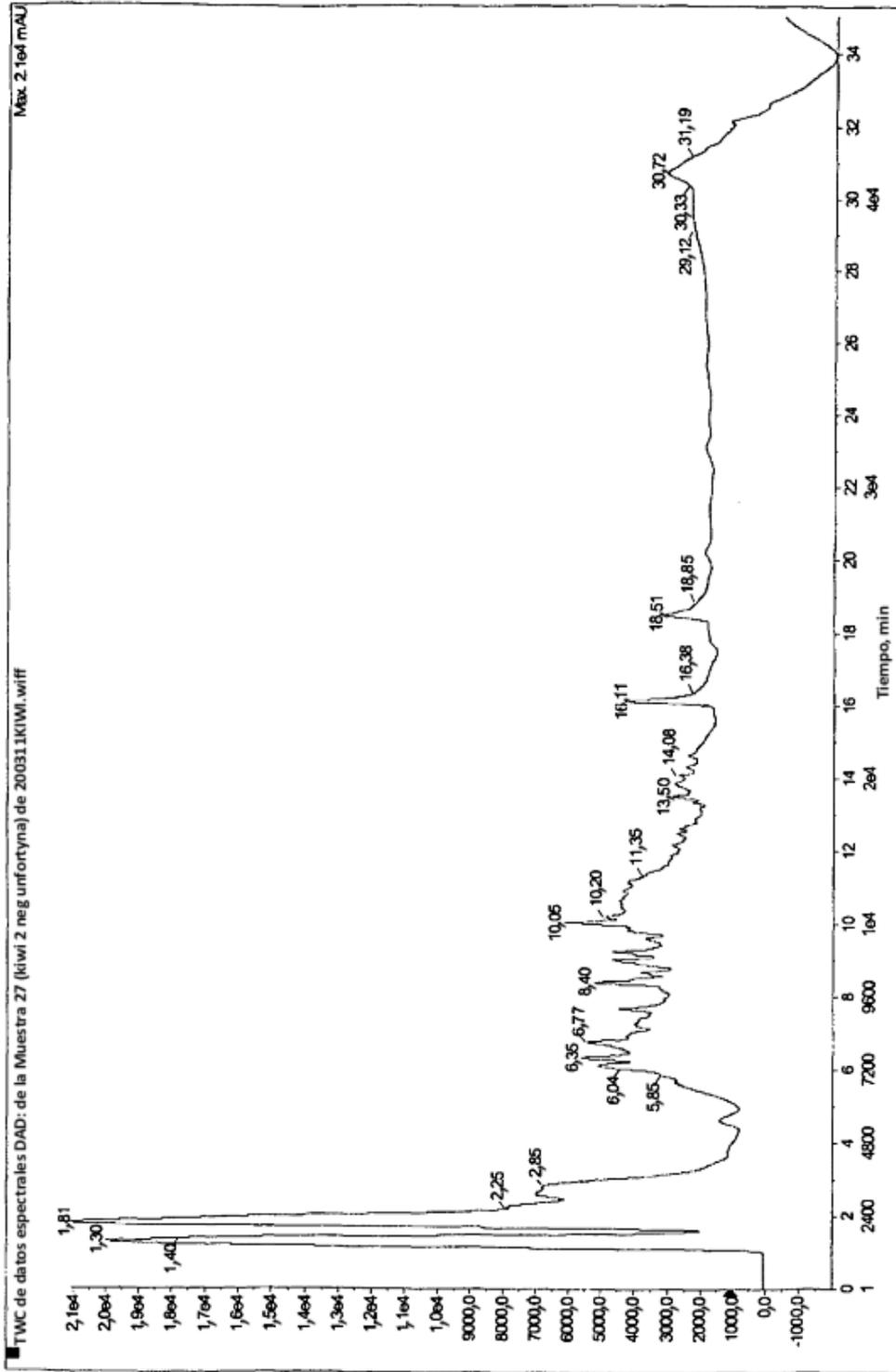


Figura 7

