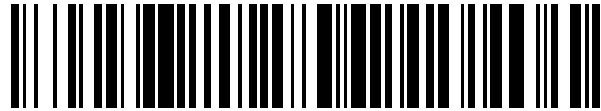


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 793**

51 Int. Cl.:

A61K 36/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2009 PCT/GB2009/002593**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10049707**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2009 E 09756337 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2349303**

54 Título: **Extractos de frutas**

30 Prioridad:

31.10.2008 GB 0819959

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

05.07.2017

73 Titular/es:

**PROVEXIS NATURAL PRODUCTS LIMITED
(100.0%)
Prospect House 58 Queens Road
Reading RG1 4RP, GB**

72 Inventor/es:

O'KENNEDY, NIAMH

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 621 793 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

Extractos de frutas

La presente invención se relaciona con un extracto de frutas que previene la agregación de plaquetas y es útil como un agente antitrombótico y métodos para hacer tales extractos.

5 Es bien establecido que el consumo de frutas y vegetales es una importante medida preventiva mediante la cual puede reducirse el riesgo de enfermedades cardiovasculares. De acuerdo con ello, se ha gastado considerable esfuerzo en un intento para identificar compuestos derivados de frutas y vegetales, que tengan un papel en la prevención de enfermedades del corazón.

10 Se ha mostrado particular interés en agentes que inhiban la agregación de plaquetas. Cuando las plaquetas se agregan dentro del sistema circulatorio se forman trombos, los cuales son lo suficientemente grandes para bloquear los vasos sanguíneos. Sin embargo, antes de que tenga lugar una completa agregación, las plaquetas pueden circular en una condición activada. Cuando están en este estado, se aumenta notablemente la adhesividad de la plaqueta, y ellas pueden añadirse una a otra, a otras células sanguíneas, o a componentes de la sangre tales como quilomicrones ricos en lípidos. Esto causa la formación de microagregados y reduce la fluidez de la sangre, afectando localmente el flujo sanguíneo, y la circulación sistémicamente. La reducción en la capacidad de las plaquetas para agregarse ayuda a mantener la sangre en estado fluido y con poca capacidad para coagularse. Esto ayuda a normalizar el flujo sanguíneo, previniendo la formación de microagregados dentro de la circulación y previniendo la adherencia de plaquetas a las paredes del vaso sanguíneo o placas grasas.

20 A la luz de esto, se reconocerá que los agentes capaces para inhibir la agregación de plaquetas son de uso en la prevención de enfermedad coronaria, por ejemplo infartos y ataque del miocardio y en la prevención de posteriores eventos tromboembólicos en pacientes que han sufrido infarto, ataque del miocardio o angina inestable. Adicionalmente, tales agentes pueden ser de uso en la prevención de restenosis que sigue a la angioplastia y procedimientos de derivación. Además, estos agentes pueden ser de uso en el tratamiento de enfermedad coronaria resultante de desórdenes tromboembólicos, tales como infarto del miocardio en unión con terapia tromboembólica.

25 Existen muchos agentes conocidos contra la agregación de plaquetas que actúan en diferentes etapas de la producción y acción de plaquetas. La aspirina (ácido acetilsalicílico) es el más ampliamente usado y estudiado. También se han usado dipiridamoles y ticlopidina. La actividad antiplaquetas de la aspirina se debe a la inhibición reversible de ciclo-oxigenasa de plaqueta, previniendo así la síntesis de tromboxano A2, un compuesto que causa la agregación de plaquetas. El indobufeno es un inhibidor reversible de ciclo-oxigenasa de plaquetas. Algunos compuestos son inhibidores directos de tromboxano A2 sintetasa, por ejemplo pirmagrel, o actúan como antagonistas en los receptores de tromboxano, por ejemplo sulotroban.

35 El documento internacional WO 99/55350 divulga que los extractos solubles en agua de varias frutas exhiben una capacidad para inhibir la agregación de plaquetas. Se consideró sorprendente que se encontró que la actividad contra la agregación de plaquetas era soluble en agua porque, en contraste, los extractos activos conocidos en la técnica en aquel tiempo eran compuestos solubles en lípidos (por ejemplo licopeno). Se encontró que estos extractos solubles en agua tenían una eficacia significativa en la prevención o reducción de agregación de plaquetas y han sido comercializados con la aprobación en Europa de Food Standards Agency, como un suplemento nutricional con beneficios para la salud.

40 O'Kennedy et al. ((2006) Am J Clin Nut Vol 84(3) p570-579), O'Kennedy et al. ((2006) Am J Clin Nut Vol 84(3) p561-569), Yamamoto et al. ((2006) Br J Nut Vol 90(6) p1031-1038) y Dutta-Roy et al. ((2001) Platelets Vol 12(4) p218-227) reportan adicionalmente sobre el efecto de extractos de tomate, hechos de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 99/55350, sobre la agregación de plaquetas humanas y confirmaron que tales extractos tienen efectos anti-trombóticos.

45 El componente activo del extracto de frutas del documento WO 99/55350 fue analizado mediante espectroscopía de masas (MS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y se encontró que contenía una mezcla de nucleósidos que tenían actividad inhibidora de agregación de plaquetas. La presente invención se basa en la comprensión de que los nucleósidos, dentro de extractos de frutas solubles en agua, pueden no ser los únicos compuestos dentro de tales extractos, que previenen la agregación anti-plaquetas. Por eso se ejerció considerable esfuerzo para fraccionar y caracterizar adicionalmente los agentes activos dentro de los extractos solubles en agua descritos en WO 99/55350, en un intento para mejorar la eficacia de tales extractos para inhibir la agregación de plaquetas y para desarrollar nuevos métodos de procesar frutas para tal uso.

55 Se ha hallado ahora que frutas de la familia de las *Solanaceae*, pueden ser procesadas de formas que den como resultado extractos solubles en agua, que tienen un efecto benéfico optimizado sobre la agregación de plaquetas. Este nuevo conocimiento ha dado la capacidad para desarrollar nuevos extractos de fruta, y métodos para hacer los

mismos, con eficacia para la inhibición de la agregación de plaquetas.

Así, de acuerdo con un primer aspecto de la invención, se suministra un método para hacer un extracto de fruta de tomate, en el que la fruta de tomate es procesada para optimizar la actividad inhibidora de agregación de plaquetas del extracto, que comprende los pasos de:

- 5 (a) preparación de una mezcla de partida de fruta homogeneizada;
- (b) separación de una fracción soluble en agua de los sólidos de fruta;
- (c) filtración de la fracción soluble en agua, para hacer el extracto sustancialmente libre de licopeno; y
- (d) concentración de los agentes activos en el permeado de filtración usando un evaporador

en el que el extracto tiene un índice de pardeamiento de <0.8 AU, un pH de 4.0-4.3 y una densidad de 1.15-1.20.

- 10 Se decidió analizar los compuestos activos en los extractos de fruta descritos en el documento WO 99/55350 (véase ejemplo 1). Ha sido sorprendente hallar que varios compuestos, hallados de manera natural en las plantas, fueron efectivos para inhibir la agregación de plaquetas. Esto condujo a notar que los métodos descritos en el documento WO 99/55350 pueden ser adaptados para desarrollar métodos que darán como resultado extractos en los cuales se mantiene el contenido de tales agentes activos (es decir, durante el procesamiento de la fruta se pierden mínimas cantidades del compuesto activo) o los agentes activos son realmente enriquecidos en la producción de un extracto de fruta. Después de mucho ensayo y error se estableció que los pasos de acuerdo con el método del primer aspecto de la invención dan como resultado extractos de fruta, que son efectivos para reducir la agregación de plaquetas, y comprenden varios compuestos activos, solubles en agua, hallados en la fruta.

(a) Preparación de una mezcla de partida

- 20 Se homogeneiza la carne de la fruta entera, preferiblemente tomates, con o sin la piel de la fruta, para formar una pasta.

De modo alternativo, como el material de partida para la preparación de la mezcla de partida pueden usarse pastas de tomate disponibles comercialmente. Donde el material de partida para la preparación de los extractos es una pasta de tomate, es preferiblemente una que ha sido producida por medio de un proceso "de ruptura en frío" más que un proceso de "ruptura en caliente". Los términos "ruptura en frío" y "ruptura en caliente" son bien conocidos en el campo del procesamiento del tomate y las pastas de tomate disponibles comercialmente son vendidas típicamente bien sea como pastas de ruptura en caliente o ruptura en frío. Las pastas de ruptura en frío pueden ser preparadas mediante un proceso que involucra la homogenización del tomate seguido por un paso de procesamiento térmico, en el cual se calientan los tomates a temperaturas no mayores a aproximadamente 60 °C, en contraste con las pastas de ruptura en caliente donde los tomates homogeneizados son sometidos a procesamiento térmico a temperaturas de aproximadamente 95 °C, véase por ejemplo, Anthon et al., J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 6153-6159.

El espesor de tales pastas (sea de fruta fresca o una pasta disponible comercialmente) debería ser ajustado mediante dilución con agua o una solución acuosa (preferiblemente agua desmineralizada) para formar una "mezcla de partida". Se ha hallado que se logra la actividad óptima en el extracto final de fruta, si la mezcla de partida es diluida de modo que contiene menos de 33% de sólidos y más preferiblemente menos de 20% de sólidos. En una realización preferida de la invención, la mezcla de partida comprende entre aproximadamente 10 y 15% de sólidos (por ejemplo 13% de sólidos).

Se ha hallado que la temperatura de retención de la mezcla de partida puede tener un efecto significativo en la actividad del extracto. Por ello, se prefiere que la temperatura de retención no exceda 35 °C y más preferiblemente no exceda 30 °C.

Se ha hallado también que el pH de la mezcla de partida tiene también impacto en la actividad del extracto preparado de acuerdo con el método de la invención. El pH de la mezcla debería ser ácido; preferiblemente inferior a pH 5.5 y en una realización preferida, el pH no debería superar 4.2. Pueden hacerse ajustes al pH, si se requiere, mediante adición de ácido cítrico.

Además, se ha hallado que el índice de pardeamiento de la mezcla de partida debería ser controlado también para optimizar la actividad del extracto final. De acuerdo con ello, el índice de pardeamiento de la mezcla de partida, definido como la absorbancia de la porción soluble a 420 nm, preferiblemente no excede 0.4 AU a 4% de sólidos. El índice de pardeamiento es un índice de pardeamiento visible causado por la formación de melanoidinas (conjugados poliméricos de composición variable, a base de azúcares y aminoácidos) y puede ser medido sometiendo a centrifugación una muestra de 50mL de la mezcla de partida a 3500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, retirando una porción del sobrenadante, diluyéndolo hasta 4% de sólidos medidos por

refractómetro, y midiendo la absorbancia de esta solución a 420nm en un espectrofotómetro.

Se ha hallado que los extractos de fruta de acuerdo con el método de la invención, han mejorado la actividad contra la agregación, si se controla por lo menos uno de la temperatura, pH e índice de pardeamiento en la mezcla de partida, como se discutió anteriormente. Se prefiere que se controlen por lo menos dos de estos pasos de control (por ejemplo temperatura y pH; o temperatura e índice de pardeamiento) y se prefiere más que se controlen la temperatura, pH e índice de pardeamiento, como se discutió anteriormente.

Se prefiere más que se mantenga la mezcla de partida a una temperatura que no es superior a 30 °C; a un pH inferior a 4.2 y con un índice de pardeamiento que no excede 0.4 AU.

(b) Separación de una fracción soluble en agua de sólidos de fruta.

Pueden retirarse sólidos insolubles en agua de una fracción soluble en agua, usando varias técnicas estándar.

Se prefiere que este paso en la metodología retire sólidos de gran tamaño insolubles en agua (es decir tamaño de partícula > 500 μ), de la mezcla de partida.

Tales sólidos pueden ser retirados mediante el uso de:

(a) un decantador (por ejemplo un decantador Westfalia GEA);

(b) un paso de separación centrífuga (por ejemplo un disco centrífugo rotativo); o

(c) un separador que contiene boquillas de tamaño ajustable (por ejemplo un separador Westfalia MSB-15, usando una mezcla de blancos y boquillas con tamaño 0.45).

De modo alternativo, puede permitirse que los sólidos sedimenten y simplemente la fracción soluble en agua se decante manualmente.

Cualquier método que se use, se ha hallado que para la retención de bioactividad óptima en la fracción soluble en agua, las temperaturas de operación no deberían exceder 60 °C. Además, se prefiere que la rata de flujo a través del equipo tiene que ser tal que la exposición a esta temperatura de 60 °C no ocurra por más de 60 segundos.

Idealmente, la fracción soluble en agua resultante debería ser enfriada después del paso de separación. Cuando la fracción va a ser almacenada, se prefiere que a continuación de la separación, sea enfriada inmediatamente a < 8 °C.

En realizaciones preferidas del paso (c) del método de la invención, puede usarse un decantador, con temperaturas de corrida de 40 - 45 °C.

Opcionalmente, el paso de separación puede ser seguido por un segundo paso de clarificación (por ejemplo usando un clarificador Alfa Lavaal) para producir una fracción clarificada soluble en agua, donde todo el material insoluble remanente tiene un tamaño de partícula < 500 μ y los sólidos de centrífuga (es decir material que es precipitado visiblemente por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente) comprenden < 1% de la fracción, en volumen.

Se ha hallado que el producto final retiene la máxima concentración de componente activo si la fracción clarificada (sin embargo producida) contiene menos de 10% de sólidos totales y más preferiblemente aproximadamente 8% de sólidos o menos.

(c) Filtración de la fracción soluble en agua

Para retirar materia en forma de partículas muy finas (< 500 μ) (por ejemplo proteína y material polimérico grande tal como algunas pectinas), la fracción soluble en agua debería ser filtrada y el permeado retenido.

La filtración puede ser lograda en una etapa individual, o en una serie de pasos de filtración, iniciando con un paso de filtración relativamente gruesa para retirar partículas más grandes de piel de tomate y/u otros fragmentos insolubles en agua de la carne de tomate. Pueden realizarse entonces otros pasos de filtración, para dar una solución sustancialmente clara, por ejemplo una solución que pasará a través de un filtro de 0.2 μ, sin pérdida de sólidos.

En una realización preferida, el paso (c) del método de la invención, comprende un paso de microfiltración que usa una unidad de filtración con filtros de membrana cerámica (por ejemplo una unidad MF de filtración cruzada Tetra Alcross equipada con filtros de membrana cerámica (por ejemplo unidades de varios elementos Pall Membralox P19-30)). Pueden usarse también membranas enrolladas en espiral como una alternativa a las membranas de cerámica.

Como una alternativa a la microfiltración, puede usarse también la ultrafiltración. Es aceptable un intervalo de tamaño de poros, por ejemplo 1.4 μ , 0.1 μ ; pero se ha hallado que el máximo enriquecimiento del permeado de filtración con componentes bioactivos (es decir mínima pérdida de componentes bioactivos y máxima exclusión de componentes no bioactivos) ocurre cuando se usan tamaños de poro de 0.1 μ .

- 5 Con objeto de retener una bioactividad óptima, las temperaturas no deberían superar 35 °C durante este paso de filtración, y el permeado de filtración debería ser enfriado inmediatamente a < 8°C después de salir de la membrana de filtración. El índice de pardeamiento del permeado final no debería exceder 0.4 AU.

10 Se ha hallado que la recuperación máxima de componentes bioactivos, y enriquecimiento del permeado de filtración en componentes bioactivos (respecto al material no filtrado), ocurre cuando el material no filtrado de partida contiene < 10% de sólidos, y cuando el permeado final contiene aproximadamente 7% de sólidos y tiene un índice de pardeamiento < 0.4 AU.

15 La eliminación de sólidos de acuerdo con los pasos (a) a (c) tiene el efecto de retirar fragmento de piel y semillas, proteínas y pectinas de peso molecular grande, y carotenoides tales como licopeno/otros lípidos que están estabilizados en gotitas dentro de la solución acuosa por la presencia de pectinas y proteínas. Así, el método suministra vías para preparar extractos de tomate que son extractos solubles en agua y son también sustancialmente libres de licopeno.

20 Los métodos descritos, en particular el control cuidadoso de la longitud de exposición a temperaturas > 35 °C (preferiblemente > 30 °C), también asegura que los extractos solubles en agua libres de licopeno preparados, no han sido sometidos a reacciones químicas de degradación que dan como resultado la producción de pardeamiento visible (reacciones de Maillard), como se demuestra por el valor de índice de pardeamiento de < 0.4 AU. Esto asegura que la formación de complejos de aminoácidos-azúcar y polímeros de melanoidina, que pueden secuestrar algunos de los componentes bioactivos, son mantenidos en un mínimo. Así, los métodos descritos dan como resultado extractos que están optimizados respecto al contenido de componente bioactivo.

25 En una realización preferida del método de la invención, el extracto de tomate es un extracto soluble en agua, sustancialmente libre de licopeno y capaz de pasar a través de un filtro de 0.2 μ sin pérdida de sólidos, y con un valor de índice de pardeamiento < 0.4 AU.

(d) Concentración de agentes activos en el permeado de filtración

El filtrado acuoso es sometido entonces a pasos adicionales de concentración/fraccionamiento, para suministrar un concentrado bioactivo que contiene compuestos responsables de inhibición de la agregación de plaquetas.

30 Después de mucha experimentación, se ha establecido que los pasos de concentración requirieron control cuidadoso si había de retenerse la bioactividad pico del extracto final o alcanzarse el enriquecimiento de bioactivos en el producto concentrado final. Se halló que la razón de esto era que el progreso de reacciones de degradación dependientes del calor y pH es acelerado a medida que aumenta la concentración de sólidos. Por ello, se notó que el control de temperatura y la longitud de exposición a la temperatura, era más crucial para extractos concentrados que para extractos diluidos.

No debería permitirse que la temperatura del extracto superara aproximadamente 60 °C para fracciones diluidas y menos de 40 °C para muestras más concentradas.

Puede usarse la evaporación de la solución bajo presión reducida, bajo condiciones donde las temperaturas no superan 60 °C.

40 Preferiblemente, se usa un evaporador de varios efectos, de modo que puedan bajarse las temperaturas a medida que el líquido pasa a través del evaporador, asegurando que el material más concentrado no es expuesto a temperaturas > 40 °C, mientras el material más diluido puede tolerar temperaturas de hasta 60 °C.

45 Usando la evaporación, puede concentrarse el extracto soluble en agua hasta 70% de sólidos, por ejemplo hasta 20% de sólidos, o a 50% de sólidos, o a 65% de sólidos. En una realización más preferida, el extracto final comprende 60-62% de sólidos después de la concentración de acuerdo con el paso (d).

El efecto de la temperatura puede ser cuantificado midiendo el índice de pardeamiento. Las temperaturas deberían ser suficientemente bajas tal que el producto concentrado final no debería superar 0.8 AU.

El concentrado final formado siguiendo los pasos (a), (b), (c) y utilizando un evaporador de acuerdo con el paso (d) tiene un índice de pardeamiento de < 0.8 AU, un pH de 4.0 -4.3 y una densidad de 1.15 - 1.20.

50 Preparación de extractos de fruta bajos en azúcar

Los métodos descritos anteriormente fueron diseñados para la producción de un concentrado que contiene todos los elementos presentes originalmente en el extracto soluble en agua.

Se ha adaptado también el método del primer aspecto de la invención, para formar un concentrado que está enriquecido (por ejemplo 25 - 35 veces) en los componentes bioactivos.

- 5 Puede lograrse el enriquecimiento de los componentes bioactivos dentro del extracto soluble en agua, retirando los azúcares solubles que forman la porción más grande de su contenido de materia seca.

Pueden prepararse extractos de fruta bajos en azúcar, siguiendo los pasos (a), (b) y (c) anteriores y luego empleando un paso adicional en los métodos antes del paso de concentración final ((d) anterior)

El retiro de los azúcares solubles puede ser logrado mediante:

- 10 (1) precipitación, por ejemplo añadiendo etanol a la solución a una concentración final de 90%, que dará como resultado la precipitación de glucosa, fructosa y sacarosa libres;
- (2) retiro parcial de Sucre libres por digestión, mediante enzimas (por ejemplo glucosa oxidasa);
- (3) por tratamiento microbiano (bacterias o levaduras); o
- 15 (4) retiro de azúcares libres del extracto soluble en agua, por separación mediante resina de los componentes del extracto.

Pueden retirarse los azúcares libres del extracto soluble en agua, por separación mediante resina de los componentes del extracto ((4) arriba). Se ha desarrollado un método en el cual se emplea una resina grado alimenticio (Amberlite FPX66) para absorber todos los componentes del extracto, con la excepción de azúcares libres, ácidos orgánicos y sales. Estos no son adsorbidos por la resina y pueden ser descartados después de pasar por ella. Los componentes del extracto adsorbidos sobre la resina, que comprenden aminoácidos, componentes bioactivos, y productos de reacciones de pardeamiento (productos de degradación de Maillard), son entonces recuperados de la resina mediante elución con mezclas etanol/agua, por ejemplo etanol al 50% o etanol al 80%. Puede retirarse el etanol de la solución resultante por evaporación bajo presión reducida (por ejemplo en un evaporador convencional a prueba de explosión, o en un concentrador centrífugo Centritherm), o por ósmosis inversa.

20

25

Después del retiro de los azúcares, puede ajustarse la concentración del producto empleando los procedimientos discutidos anteriormente en el paso (d).

El extracto resultante bajo en azúcar puede ser una solución acuosa concentrada que contiene < 1% de azúcar, y que contiene > 95% de los componentes bioactivos presentes en la mezcla de partida.

- 30 Extractos de fruta

Los extractos preparados de acuerdo con los métodos del primer aspecto de la invención representan extractos novedosos de fruta con eficacia sorprendente para prevenir la agregación de plaquetas.

Por ello, de acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se suministra un extracto de fruta de tomate sustancialmente libre de licopeno, que comprende:

- 35 (a) ácido fenólico o un éster fenólico glicosilado, o derivados del mismo;
- (b) un flavonoide glicosilado; y
- (c) un nucleósido.

en el que el extracto tiene un índice de pardeamiento de <0.8AU, un pH de 4.0-4.3 y una densidad de 1.15-1.20.

Los extractos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención pueden ser usados para tratar, y en particular prevenir el desarrollo de estados de enfermedad que se caracterizan por agregación inapropiada de plaquetas. Se ha establecido que los extractos de la invención son particularmente útiles para:

40

- (a) prevenir o reducir la ocurrencia de un estado hipercoagulable o protrombótico, tal como se asocia frecuentemente con condiciones tales como diabetes mellitus, enfermedad de intestino inflamatorio, hiperlipidemia
- (b) prevenir o reducir el desarrollo de aterosclerosis
- 45 (c) prevenir el desarrollo de enfermedad coronaria (por ejemplo infarto y ataque del miocardio y prevenir eventos

tromboembólicos adicionales en pacientes que han sufrido infarto, ataque del miocardio o angina inestable).

(d) prevenir el desarrollo de restenosis que sigue a procedimientos de angioplastia y derivación.

(e) tratar enfermedad coronaria resultante de desórdenes tromboembólicos tales como infarto del miocardio junto con terapia trombolítica.

5 (f) prevenir o reducir el riesgo de trombosis venosa profunda

(g) beneficiar la circulación para mantener buena salud circulatoria

(h) mantener un saludable flujo sanguíneo en el sistema cardiovascular.

10 Se apreciará que los extractos de la invención tendrán beneficios generales de salud para mantener la salud cardiovascular y del corazón, reduciendo la agregación de plaquetas, beneficiando la circulación y/o normalizando o beneficiando de otro modo el flujo sanguíneo (como se delinea por ejemplo en (g) y (h) anteriormente).

Puede usarse un extracto de fruta de acuerdo con los métodos de la invención, como un medicamento para normalizar o de otro modo beneficiar el flujo sanguíneo en un paciente.

15 Las composiciones que comprenden extractos de la invención serán útiles como productos farmacéuticos, pero representarán también alimentos funcionales benéficos o "nutracéuticos". De acuerdo con ello, las composiciones se usan de modo preferido como medicamentos y alimentos o bebidas funcionales (como se delinea posteriormente).

Los extractos preferidos de fruta de la invención son extractos acuosos de tomates maduros (es decir rojos), y son solubles en agua.

20 Como se usa aquí, el término "soluble en agua" indica que los extractos de tomates son solubles a temperatura ambiente, por ejemplo a 25 °C. Se ha hallado también que los extractos son solubles en agua a temperaturas muy inferiores, por ejemplo a temperaturas tan bajas como 4 °C.

25 Los extractos no contienen o contienen sólo cantidades despreciables de licopeno. Por ejemplo los extractos contienen menos de 0.5% en peso (peso seco) de licopeno, por ejemplo menos de 0.1%, o menos de 0.05%, o menos de 0.01%, o menos de 0.005%, o menos de 0.001%, o menos de 0.0005%, o menos de 0.0001%, en peso (peso seco) de licopeno.

30 Los extractos son sustancialmente libres de material en forma de partículas insoluble en agua. Así, por ejemplo, ellos contienen menos de 0.5% en peso (peso seco) de material en forma de partículas insoluble en agua, por ejemplo menos de 0.1%, o menos de 0.05%, o menos de 0.01%, o menos de 0.005%, o menos de 0.001%, o menos de 0.0005%, o menos de 0.0001%, en peso, (peso seco) de material en forma de partículas insoluble en agua. En una realización, los extractos no contienen material en forma de partículas insoluble en agua.

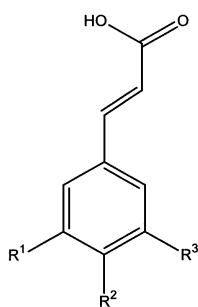
Como se usa aquí, el término "fracción activa" se refiere a una fracción aislada de un extracto de tomate, fracción que tiene la habilidad de reducir la agregación de plaquetas.

35 La investigación (véase ejemplo 1) estableció que pueden prepararse extractos de fruta, en los cuales varios bioactivos son enriquecidos o mantenidos en un extracto que a continuación va a ser usado para prevenir o tratar condiciones médicas caracterizadas por agregación inapropiada de plaquetas. Los métodos del primer aspecto de la invención fueron desarrollados con objeto de mantener tales bioactivos. Se ha establecido que los extractos preparados de acuerdo con la invención comprenden varias moléculas bioactivas que incluyen:

(A) Compuestos fenólicos bioactivos en el extracto de la invención

40 Se ha establecido que varias moléculas a base de fenol y derivados de ellas están presentes en la fruta y tienen eficacia para prevenir la agregación de plaquetas (véase ejemplo 1).

Se encontró que en particular el ácido cinámico, y derivados del mismo son particularmente efectivos para inhibir la agregación de plaquetas. Por ello, se diseñaron los métodos del primer aspecto de la invención, para asegurar que el extracto comprende ácido cinámico o un derivado del mismo, como se define por la fórmula I:

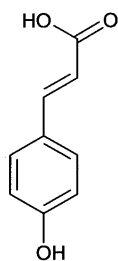


Fórmula I

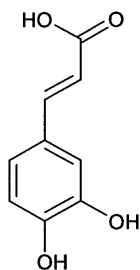
en la fórmula I, R¹ y R² y R³ pueden ser seleccionados independientemente de H, OH y Ome.

El compuesto puede ser ácido cinámico per se (donde R¹, R² y R³ de la fórmula I son H) o puede ser uno cualquiera de diferentes derivados, incluyendo:

- 5 ácido 4-hidroxicinámico (ácido p-cumárico)

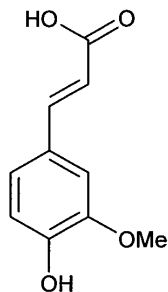


- ácido 3,4-dihidroxicinámico (ácido cafeico)

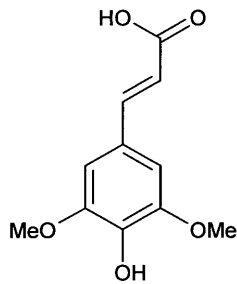


10

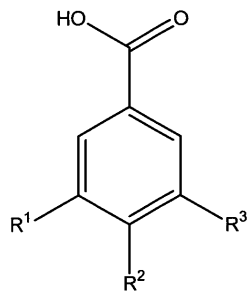
- ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (ácido ferúlico)



- ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico (ácido sinápico)



5 Se identificó también en extractos de fruta una clase adicional de derivados de fenol, ácidos benzoicos de planta y derivados de ellos, que es efectiva también para inhibir la agregación de plaquetas. Por ello, pueden ajustarse los métodos del primer aspecto de la invención, para asegurar que el extracto comprende un ácido benzoico o derivado del mismo, como se define por la fórmula II:

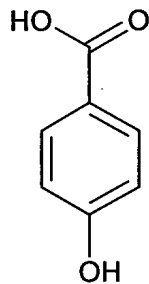


Fórmula II

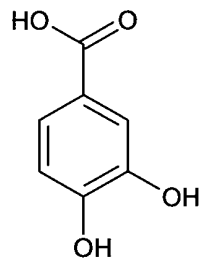
En la fórmula II, R¹ y R² y R³ son como se definió previamente.

10 De acuerdo con ello, los extractos preferidos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención pueden comprender ácido benzoico per se (en el que cada uno de R¹, R² y R³ son H) o uno cualquiera de varios derivados, por ejemplo:

ácido 4-hidroxibenzoico (ácido p-hidroxibenzoico)

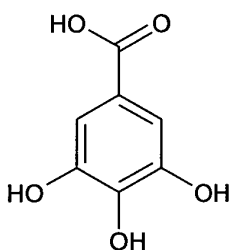


ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido protocatecuico),

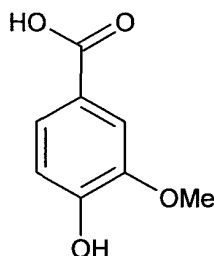


15

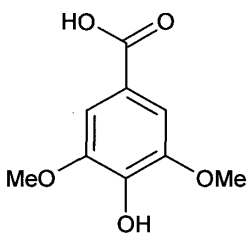
ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico)



ácido 4-hidroxi-3,-metoxibenzoico (ácido vanílico)



ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (ácido sirínigico)



5

10 Durante el trabajo con extractos de fruta fue sorprendente descubrir que bioactivos fenólicos que están conjugados con otras moléculas bien sea a través de un enlace éster en el grupo ácido carboxílico, para formar un éster carboxílico, o a través de un enlace éter en un sustituyente hidroxilo fenólico para formar un glicósido, fueron particularmente eficaces en la reducción de agregación de plaquetas y por ello útiles para el tratamiento o prevención del desarrollo de una variedad de condiciones cardiovasculares. Por ello, el método del primer aspecto de la invención fue diseñado para asegurar que el extracto comprende un bioactivo fenólico conjugado con otras moléculas.

15 Se prefiere que los bioactivos estén conjugados con azúcares para formar glicósidos. Se ha hallado que varios diferentes glicósidos bioactivos están presentes en los extractos. De acuerdo con ello, por el término "glicósido", se entiende por lo menos un residuo de azúcar de hexosa o pentosa conjugado con el bioactivo; preferiblemente se añaden unidades de monosacárido 1-5 y más preferiblemente 1-3 por reacción en un grupo OH en el compuesto bioactivo. La glucosa, galactosa o arabinosa y también di-/trisacáridos de estos azúcares son añadidos con máxima preferencia al compuesto, para formar glicósidos derivados de ácido fenólico.

20 De modo alternativo, los compuestos bioactivos pueden estar conjugados con varios compuestos hallados en plantas (por ejemplo ácido tartárico, ácido quínico) para formar ésteres. Tales compuestos pueden ser compuestos de cadena abierta tales como ácido tartárico o compuestos heterocíclicos tales como ácido quínico y pueden derivarse de la ruta de carbohidratos en plantas. Con máxima preferencia son añadidos ácido tartárico o ácido quínico al compuesto, para formar derivados de éster fenólico.

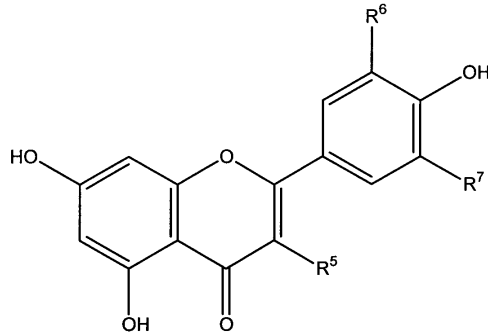
25 Se prefiere que el método de la invención enriquezca el extracto, tal que comprenda un glicósido seleccionado del grupo que incluye: ácido cafeico 3-O-glicósido, ácido cafeico 4-O-glicósido, ácido ferúlico 4-O-glicósido, ácido p-cumárico 4-O-glicósido, o un derivado esterificado seleccionado del grupo que comprende ácidos cafeoilquínicos (por ejemplo ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 4-O-cafeoilquínico o ácido 5-O-cafeoilquínico), ácidos feruloilquínicos, ácidos p-cumaroilquínicos, ácidos cafeoiltartáricos, ácidos feruloiltartáricos, ácidos p-cumaroiltartáricos, dímeros de derivados de ácido quínico.

30 De acuerdo con ello, el extracto del segundo aspecto de la invención puede comprender por lo menos un glicósido de ácido cinámico o derivado del mismo, seleccionado de los compuestos listados anteriormente y puede comprender también por lo menos un glicósido de un ácido benzoico o derivado del mismo seleccionado de los compuestos listados anteriormente.

(B) Compuestos flavonoides bioactivos en el extracto de la invención

Se estableció también que se logra la inhibición óptima de agregación de plaquetas en extractos que contienen también un flavonoide glicosilado.

El extracto contiene preferiblemente un flavonoide de la fórmula general (III):

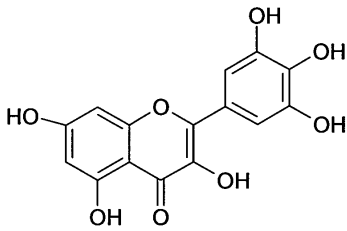


Fórmula III

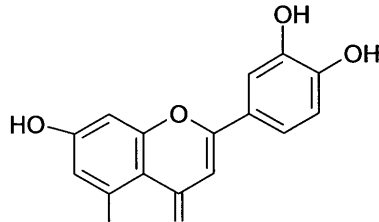
5

en la que R⁵, R⁶ y R⁷ son independientemente H, OH.

Preferiblemente, el extracto comprende uno de los siguientes flavonoides:

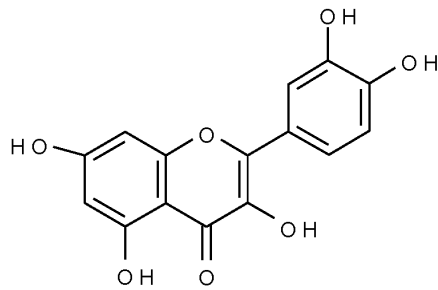


Miricetina

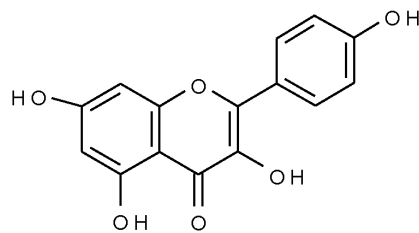


Luteolina

10



Quercetina

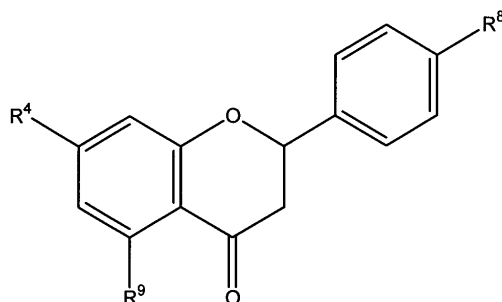


Kaempferol

Se prefiere al máximo que el extracto contenga quercetina o kaempferol o derivados de ellos.

Se ha establecido también que flavonoides bioactivos que están conjugados con otras moléculas (es decir azúcares) son particularmente eficaces para reducir la agregación de plaquetas.

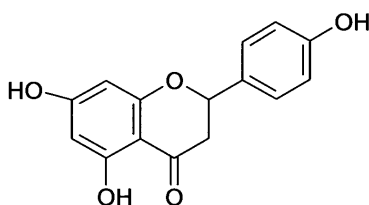
5 La naringenina y derivados de ella representan otro tipo de flavonoide hallado en extractos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, de los cuales se ha hallado que tienen actividad para inhibir la agregación de plaquetas. Por ello, el extracto puede comprender moléculas de la fórmula general IV.



Fórmula IV

R⁴, R⁸ y R⁹ son como se definió anteriormente.

Un compuesto preferido definido por la fórmula IV, presente en el extracto, es naringenina.

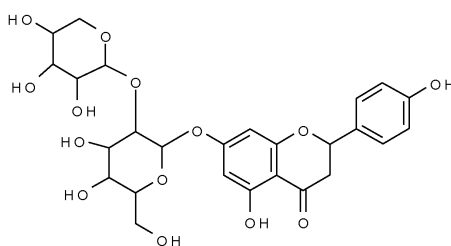


Naringenina

10

Se ha establecido también que los compuestos de la fórmula general (IV) que están conjugados con otras moléculas (es decir azúcares) son particularmente eficaces para la reducción de agregación de plaquetas.

Un compuesto flavonoide glicosilado preferido al máximo hallado en los extractos de la invención es naringina.



Naringina

15

Se ha hallado que los extractos preferidos pueden comprender compuestos bioactivos fenólicos y flavonoides discutidos anteriormente, que están conjugados uno con otro. Por ejemplo, el ácido cafeico 4-O-rutinósido es una molécula con propiedades contra la agregación de plaquetas, donde se hace un enlace glicósido entre ácido cafeico y un residuo de azúcar en rutina (que comprende quercetina).

20 (C) Nucleósidos/Nucleótidos

Como se contempla en el documento WO 99/55350, los extractos de fruta con actividad contra las plaquetas pueden comprender además un nucleósido. El extracto puede comprender por lo menos un nucleósido seleccionado de adenosina 5'-monofosfato, citidina, uridina, adenosina, inosina, guanosina y guanosina 5'-monofosfato.

25 Se apreciará que se han identificado varios compuestos bioactivos en diferentes fracciones de extractos de tomate. Se pudieron adaptar métodos para la preparación de extractos de fruta, tales que los compuestos activos que se identificaron fueron mantenidos y/o enriquecidos en tales extractos de fruta.

Preferiblemente el ácido fenólico glicosilado es un ácido cinámico glicosilado o derivado de él. Con máxima

- preferencia el extracto comprende por lo menos uno de ácido cafeoil-4-O-quinico, cafeoil-4-O-glucósido, cumaroil-4-O-glucósido (gluc / gal) o cumaroil-4-O-glucósido (disacárido). El extracto puede comprender 1, 2, 3 o de cada uno de estos glicósidos. En una realización preferida de la invención, el extracto de fruta de acuerdo con el tercer aspecto de la invención comprende un ácido cinámico glicosilado o derivado de él y un ácido benzoico o derivado de él,
- 5 como se discutió anteriormente.
- Se prefiere al máximo que el extracto incluya ácido cafeico glucósido; y/o ácido p-cumárico hexosa / dihidrokaempferol hexosa; y/o ácido ferúlico glicósido; y/o un derivado de ácido p-cumárico.
- El flavonoide glicosilado es preferiblemente naringina, quercetina - 3 -O-glucósido o rutina. El extracto puede comprender uno, dos o cada uno de estos glicósidos. El bioactivo es con máxima preferencia rutina.
- 10 El nucleósido puede ser uno cualquiera de AMP, uridina, adenosina, guanosina o GMP. El extracto puede comprender 1, 2, 3, 4 o cada uno de estos nucleósidos. El nucleósido es preferiblemente guanosina y/o adenosina 3'-mono fosfato.
- El extracto de fruta de acuerdo con la invención puede contener también opcionalmente un glicósido esteroideal tal como tomatidina.
- 15 Preferiblemente los extractos de fruta no contienen grasas o carotenoides.
- Se encontró que dos extractos preferidos, que pueden ser preparados a partir de frutas de tomate de acuerdo con los métodos de la invención, comprenden los siguientes compuestos bioactivos en las concentraciones especificadas (mg/g):
- (1) Un extracto preferido, preparado de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 2, comprende:
- 20 (a) El siguiente ácido fenólico o ésteres fenólicos glicosilados:
- Ácido cafeico glucósido (0.01 - 1 mg/g);
- mezcla de ácido p-cumárico hexosa / dihidrokaempferol hexosa mixture (0.05 - 2.5mg/g) ácido ferúlico glicósido (0.025 - 5mg/g); y
- derivado de ácido p-cumárico (0.01 - 1 mg/g).
- 25 (b) El flavonoide glicosilado: rutina (0.01 - 1 mg/g).
- (c) Los siguientes nucleósidos / nucleótidos:
- Guanosina (0.1 - 5mg/ml); y
- Adenosina 3'-monofosfato (0.5 - 25mg/ml)
- (2) Un extracto preferido bajo en azúcar, preparado de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 3,
- 30 comprende:
- (a) El siguiente ácido fenólico o ésteres fenólicos glicosilados:
- Ácido cafeico glucósido (1-25mg/g);
- mezcla de ácido p-cumárico hexosa / dihidrokaempferol hexosa (5-100mg/g);
- ácido ferúlico glicósido (25-300mg/g); y
- 35 derivado de ácido p-cumárico (1-25mg/g)
- (b) El flavonoide glicosilado: rutina (1-25mg/g)
- (c) Los siguientes nucleósidos / nucleótidos:
- Guanosina (1-50mg/g); and
- Adenosina 3'-mono fosfato (1-50mg/g);
- 40 En la tabla 1 se identifican dos extractos específicos de tomate que incluyen el segundo aspecto de la invención. La tabla 1 identifica 16 compuestos (en la columna 3 y se suministra también el No. ID en la columna 2) que se aislaron y probaron (véase ejemplo 1) y se encontró que tenía la mayoría de actividad contra plaquetas. De acuerdo

con ello, se prefiere que los extractos de acuerdo con la invención comprendan cada uno de estos 16 compuestos bioactivos. Se apreciará que los métodos del primer aspecto de la invención son diseñados preferiblemente para optimizar la actividad de estos compuestos en un extracto de fruta.

5 La tabla 1 identifica también los intervalos (mg/g de peso húmedo) de cada compuesto bioactivo hallado en extractos preparados de acuerdo con los métodos especificados en los ejemplos 2 y 3 respectivamente. Se muestra también el promedio de concentración (mg/g). Los extractos con máxima preferencia de acuerdo con el segundo o tercer aspectos de la invención, comprenden compuestos bioactivos en estos intervalos especificados.

Tabla 1: compuestos contra las plaquetas en extracto de tomate, agrupados por tipo de compuesto.

Tipo de bioactivo	ID compuesto	Compuesto bioactivo	Extracto preferido preparado de acuerdo con métodos del ejemplo 2			Extracto bajo en azúcar preferido, preparado de acuerdo con métodos del ejemplo 3		
			Intervalo inferior mg/g	Intervalo superior mg/g	Promedio mg/g	Intervalo inferior mg/g	Intervalo superior mg/g	Promedio mg/g
Nucleótidos	2	Adenosina	0.382	2.440	2.033	1.800	2.927	2.439
	4	Guanosina	0.400	1.759	1.466	6.970	19.354	16.128
	5	Adenosina 3'-monofosfato	1.312	11.491	9.576	6.421	16.087	13.406
	6	Adenosina 5'-monofosfato						
	8	Ácido p-cumárico hexosa / derivado de ácido quínico	0.050	0.456	0.380	9.418	11.867	9.889
	9	Ácido cafeico glucósido	0.069	0.477	0.398	3.736	13.402	11.168
10	Ácido ferúlico hexosa	0.028	0.048	0.040	0.706	1.340	1.117	
Glicósidos fenólicos	11	Mezcla de ácido p-cumárico hexosa / dihidrokaempferol hexosa	0.277	0.997	0.831	26.121	40.288	33.573
	12	Conjugado de ácido p-cumárico / ácido cafeico, glicosilado	0.170	1.419	1.182	90.872	131.722	109.768
Derivados de éster fenólico	13	Ácido ferúlico glucósido	0.155	1.199	0.999	85.333	199.679	166.399
	14	Ácido clorogénico	0.131	0.953	0.794	18.274	43.366	36.138
Flavonoide glicósidos	15	Derivado de ácido p-cumárico	0.105	0.332	0.277	8.620	16.584	13.820
	23	Quercetina-3-O-glicósido	0.050	0.324	0.270	8.463	13.257	11.048
	25	Quercetina-3-O- trisacáridos	0.157	0.610	0.508	14.679	24.799	20.666
	26	Naringina	0.739	2.103	1.753	38.016	61.709	51.424
	27	Rutina	0.583	2.804	2.337	50.688	106.147	88.456

Siguiendo el análisis detallado de compuestos bioactivos presentes en un extracto de tomate, se llegó a la conclusión de que otros 16 compuestos también tenían actividad contra la agregación. Por ello, se notó que la mayoría de los extractos preferidos de acuerdo con el segundo o tercer aspectos de la invención contenían los 32 compuesto bioactivos identificados en la tabla 2.

Tabla 2: extractos más preferidos que comprenden 32 compuesto bioactivos

Grupo	ID compuesto	Compuesto bioactivo	Extracto preferido preparado de acuerdo con métodos del ejemplo 2			Extracto bajo en azúcar preferido, preparado de acuerdo con métodos del ejemplo 3		
			Intervalo inferior mg/g	Intervalo superior mg/g	Promedio mg/g	Intervalo inferior mg/g	Intervalo superior mg/g	Promedio mg/g
Nucleósidos	1	Citidina	0.487	2.051	1.709	21.971	36.911	30.759
	2	Adenosina	0.382	2.440	2.033	1.800	2.927	2.439
	3	Uridina	0.414	2.089	1.741	21.917	31.340	26.117
	4	Guanosina	0.400	1.759	1.466	6.970	19.354	16.128
Nucleótidos	5	Adenosina 3'-monofosfato						
	6	Adenosina 5'-monofosfato	1.312	11.491	9.576	6.421	16.087	13.406
Glicosidos de ácido fenólico	7	Glicosidos mixtos de ácido fenólico	0.352	0.956	0.796	20.982	145.537	121.281
	8	Ácido p-cumárico hexosa / derivado de ácido quinico	0.050	0.456	0.380	9.418	11.867	9.889
	9	Ácido cafeico glucósido	0.069	0.477	0.398	3.736	13.402	11.168
	10	Ácido ferúlico hexosa	0.028	0.048	0.040	0.706	1.340	1.117
	11	Mezcla de ácido p-cumárico hexosa/ dihidrokaempferol hexosa	0.277	0.997	0.831	26.121	40.288	33.573
	12	Conjugado de ácido p-cumárico / ácido cafeico, glicosilado	0.170	1.419	1.182	90.872	131.722	109.768
Ácidos fenólicos	13	Ácido ferúlico glicósido	0.155	1.199	0.999	85.333	199.679	166.399
	14	Ácido clorogénico	0.131	0.953	0.794	18.274	43.366	36.138
	15	Derivados de este fenólico	0.105	0.332	0.277	8.620	16.584	13.820
	16	Dimero de ácido cafeoil-quinico #1	0.066	0.701	0.584	13.850	85.176	70.980

Grupo	ID compuesto	Compuesto bioactivo	Extracto preferido preparado de acuerdo con métodos del ejemplo 2			Extracto bajo en azúcar preferido, preparado de acuerdo con métodos del ejemplo 3		
			Intervalo inferior mg/g	Intervalo superior mg/g	Promedio mg/g	Intervalo inferior mg/g	Intervalo superior mg/g	Promedio mg/g
Ácidos fenólicos	17	Dímero de ácido cafeoil-quinico #2	0.142	0.701	0.584	12.672	22.731	18.943
	18	Ácido cafeico	0.058	0.873	0.727	5.842	9.042	7.535
	19	Ácido p-cumárico	0.046	0.488	0.407	11.403	27.568	22.974
	20	Ácido benzoico	0.006	0.077	0.064	0.959	1.554	1.295
	21	Ácido ferúlico	0.016	0.140	0.117	0.584	1.113	0.927
	22	Ácido cinámico	0.028	0.084	0.070	1.966	6.896	5.747
Flavonoide glicósidos	23	Quercetina-3-O-glicósido	0.050	0.324	0.270	8.463	13.257	11.048
	24	Kaempferol glicósido	0.008	0.049	0.041	1.269	5.277	4.398
	25	Quercetina-3-O- trisacáridos	0.157	0.610	0.508	14.679	24.799	20.666
	26	Naringina	0.739	2.103	1.753	38.016	61.709	51.424
	27	Rutina	0.583	2.804	2.337	50.688	106.147	88.456
	28	Conjugado de flavonoide	0.004	0.032	0.027	0.846	1.733	1.444
	29	Trazas de flavonoide + glicósidos	1.253	3.900	3.250	90.660	319.469	266.224
Flavonoides	30	Quercetina	0.014	0.130	0.108	3.787	20.578	17.149
	31	Kaempferol	0.039	0.180	0.150	3.749	8.230	6.858
	32	Naringenina	trazas	1.540	trazas	trazas	25.600	trazas

Un extracto preferido de acuerdo con la invención comprende la recombinación de la fracción 1, fracción 2 y fracción 3 como se menciona en el ejemplo 1 (1.1.3) para formar un extracto recombinado. Se ha hallado que tal extracto recombinado está enriquecido en los bioactivos discutidos anteriormente y tuvo una sorprendente mejora en la eficacia para inhibir la agregación de plaquetas.

5 Formulaciones farmacéuticas y nutracéuticas que comprenden el extracto de fruta

Los extractos de fruta de la invención pueden ser formulados para administración oral. Como tal, ellos pueden ser formulados como soluciones, suspensiones, jarabes, comprimidos, cápsulas, pastillas y barras comestibles, insertos y parches, a modo de ejemplo. Tales formulaciones pueden ser preparadas de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

10 Por ejemplo, el extracto puede tener forma de un jarabe u otra solución para administración oral, por ejemplo como una bebida saludable. En tales jarabes o soluciones pueden incluirse uno o más excipientes seleccionados de azúcares, vitaminas, agentes saborizantes, agentes colorantes, conservantes y espesantes. Pueden añadirse agentes para el ajuste de tonicidad, tales como cloruro de sodio, o azúcares, para suministrar a una solución una fuerza osmótica particular, por ejemplo una solución isotónica. Pueden usarse también uno o más agentes para el
15 ajuste de pH, tales como agentes amortiguadores, para ajustar el pH a un valor particular, y preferiblemente mantenerlo en aquel valor. Los ejemplos de agentes amortiguadores incluyen amortiguadores de citrato de sodio/ácido cítrico y amortiguadores de fosfato.

De modo alternativo, puede secarse el extracto (por ejemplo por atomización por secado o secado por congelación) y formularse el producto seco en una forma sólida o semisólida de dosificación, por ejemplo como un comprimido,
20 pastilla, cápsula, polvo, granulado o gel.

Pueden prepararse composiciones que contienen los extractos, sin otros componentes adicionales. De modo alternativo, ellas pueden ser preparadas mediante adsorción sobre un soporte sólido; por ejemplo, un azúcar tal como sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, manosa o un azúcar alcohol tal como xilitol, sorbitol o manitol; o un derivado de celulosa. Otros adsorbentes particularmente útiles incluyen adsorbentes a base de almidón tales como
25 harinas de cereal, por ejemplo harina de trigo y harina de maíz.

Para la formación del comprimido, típicamente puede mezclarse el extracto con un diluyente tal como un azúcar, por ejemplo sacarosa y lactosa, y azúcar alcoholes tales como xilitol, sorbitol y manitol; o celulosa modificada o derivados de celulosa tales como celulosa en polvo o celulosa microcristalina o carboximetilcelulosa. Los comprimidos también contendrán típicamente uno o más excipientes seleccionados de agentes de granulación, aglutinantes, lubricantes y agentes de desintegración. Los ejemplos de agentes de desintegración incluyen almidón y derivados de almidón y otros polímeros que pueden hincharse, por ejemplo agentes de desintegración poliméricos entrecruzados tales como carboximetilcelulosa entrecruzada, polivinilpirrolidona entrecruzada y glicolatos de almidón. Ejemplos de lubricantes incluyen estearatos tales como estearato de magnesio y ácido esteárico. Ejemplos de aglutinantes y agentes de granulación incluyen polivinilpirrolidona. Cuando el diluyente no es
35 naturalmente muy dulce, puede añadirse un edulcorante, por ejemplo glicirricinato de amonio o un edulcorante artificial tal como aspartame, o sacarinato de sodio.

Los extractos pueden ser formulados también como polvos, gránulos o semisólidos para incorporación dentro de cápsulas. Cuando se usan en la forma de polvos, los extractos pueden ser formulados junto con uno cualquiera o más de los excipientes definidos anteriormente en relación con comprimidos, o pueden presentarse en forma no diluida. Para presentación en la forma de un semisólido, los extractos secos pueden ser disueltos o suspendidos en un líquido viscoso o vehículo semisólido tal como un polietilenglicol, o un vehículo líquido tal como glicol, por ejemplo propilenglicol, o glicerol o un aceite vegetal o de pescado, por ejemplo un aceite seleccionado de aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de onagra, aceite de soja, aceite de hígado de bacalao, aceite de arenque, etc. Tales extractos pueden ser empacados dentro de cápsulas, bien sea de gelatina dura o gelatina suave o hechos de equivalentes de gelatina dura o suave, donde para rellenos de líquido viscoso o semisólidos se prefieren cápsulas de gelatina suave o de equivalente de gelatina.
45

Los extractos de acuerdo con la invención pueden ser suministrados también en forma de un polvo, para incorporación en una barra de producto alimenticio, por ejemplo barras de fruta, barras de nuez y barras de cereal. Para la presentación en la forma de barras de producto alimenticio, los extractos pueden mezclarse con uno cualquiera o más ingredientes seleccionados de frutas secas tales como tomates secos al sol, pasas y sultanas, cacahuetes o cereales tales como avena y trigo.
50

Los extractos de acuerdo con la invención pueden ser suministrados también en forma de un polvo para reconstitución como una solución. Como tal, ellos pueden contener también excipientes solubles tales como azúcares, agentes amortiguadores tales como amortiguadores de citrato y fosfato, y agentes efervescentes formados de carbonatos, por ejemplo bicarbonatos tales como bicarbonato de sodio o amonio y un ácido sólido
55

como por ejemplo ácido cítrico o una sal de citrato.

En una realización preferida, se suministra un extracto de acuerdo con la invención, en forma de polvo opcionalmente junto con un excipiente sólido preferido (por ejemplo pulverizado) para incorporación dentro de cápsulas, por ejemplo una cápsula de gelatina dura.

- 5 Una forma de dosificación sólida o semisólida de la presente invención puede contener hasta aproximadamente 1000 mg de la composición, por ejemplo hasta aproximadamente 800 mg.

El extracto puede presentarse como suplemento alimenticio o aditivo alimenticio, o puede ser incorporado dentro de alimentos, por ejemplo alimentos funcionales o nutracéuticos.

- 10 Los extractos de la invención pueden presentarse en la forma de formas de dosificación unitaria que contienen una concentración definida de compuestos con actividad para inhibir la agregación de plaquetas. Tales formas de dosificación unitaria pueden ser seleccionadas para alcanzar un nivel deseado de actividad biológica. Por ejemplo, una forma de dosificación unitaria puede contener una cantidad de hasta 1000 mg (peso seco) de una composición de acuerdo con la presente invención, más típicamente hasta 800 mg, por ejemplo 50 mg a 800 mg, por ejemplo 100 mg a 500 mg. Cantidades particulares de la composición que pueden ser incluidas en una forma de dosificación unitaria pueden ser seleccionadas de 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg y 800 mg.

Los extractos de la invención pueden ser incluidos en un contenedor, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración.

En el ejemplo 5 se definen productos preferidos que comprenden extractos de acuerdo con la invención.

- 20 Dosificación

Para el tratamiento de las enfermedades y condiciones involucradas, la cantidad del extracto de acuerdo con la invención administrada a un paciente por día, dependerá de la condición o enfermedad particular bajo tratamiento y su severidad, y finalmente estará a discreción del facultativo. Sin embargo, la cantidad administrada será típicamente una cantidad efectiva no tóxica para tratar la condición en cuestión.

- 25 Para una composición que contiene azúcares, la dosificación diaria recomendada de un extracto de fruta preparado de acuerdo con los métodos de la invención, está entre 0.5g y 20g y más preferiblemente entre 2g y 7g. Una dosificación diaria puede ser de aproximadamente 3g. Para una composición baja en azúcar (véase arriba), la dosificación diaria recomendada puede estar entre 10mg y 500mg y está más preferiblemente entre aproximadamente 85mg y aproximadamente 150mg.

- 30 Un régimen típico de dosificación diaria para un paciente humano que sufre de una enfermedad cardiovascular puede estar desde aproximadamente 70mg a 285mg, preferiblemente aproximadamente 25mg a 100mg por kilogramo de peso corporal, de un extracto que contiene azúcares de fruta y puede estar desde aproximadamente 1 mg a 2.25mg 100mg por kilogramo de peso corporal de un extracto bajo en azúcar.

- 35 El extracto puede ser administrado en unidades de dosificación individuales o múltiples por día, por ejemplo de una a cuatro veces diariamente, preferiblemente una a dos veces diariamente. Se prefiere al máximo que el extracto sea dado como una dosificación diaria individual.

Los extractos pueden ser administrados en la forma de jugo de tomate o concentrados de él, solos o en mezcla con otros jugos de fruta, tales como jugo de naranja.

Indicaciones de efectividad terapéutica

- 40 La habilidad de composiciones que comprenden extractos de la invención, para suministrar efectos terapéuticos benéficos puede ser evaluada con referencia a varios diferentes parámetros. Los ejemplos abajo suministran detalles de protocolos adecuados para la evaluación de agregación de plaquetas o hemostasis primaria, la cual puede investigarse con objeto de evaluar la efectividad terapéutica. El equipo de análisis PFA-100® de función de plaquetas descrito en los ejemplos es un dispositivo relativamente nuevo para la evaluación de hemostasis primaria, pero ha sido bien validado (véase, por ejemplo, "The plateletfunction analyzer (PFA-100®) for evaluating primary hemostasis" por M. Franchini Hematology, volumen 10, entrega 3 junio 2005, páginas 177-181).

- 45 Otros parámetros que pueden ser evaluados para este propósito incluyen la fluidez de la sangre y flujo de sangre, donde un aumento en la fluidez o flujo será indicativo generalmente de un efecto terapéutico útil.

Métodos de medición de fluidez de la sangre

Puede obtenerse una medición directa de la fluidez de la sangre usando un equipo de análisis de flujo de arreglo de microcanal (MC-FAN), tal como el MC-FAN HR300 disponible de Arkray, el cual imita los vasos capilares.

5 En "Determinants of the daily rhythm of blood fluidity", por Tatsushi Kimura, Tsutomu Inamizu, Kiyokazu Sekikawa, Masayuki Kakehashi y Kiyoshi Onari (Journal of Circadian Rhythms 2009, 7:7) se suministra un protocolo adecuado de uso de un MC-FAN.

10 Brevemente, se forman microranuras con ancho 7 μm , longitud 30 μm , profundidad 4.5 μm , por ejemplo mediante fotofabricación en la superficie de un chip individual de cristal de silicio. Las dimensiones adecuadas del chip pueden estar alrededor de 15 X 15 mm. Las microranuras son entonces formadas dentro de microcanales a prueba de fuga que representan capilares. Esta conversión en canales puede ser lograda, por ejemplo, cubriendo herméticamente los canales con una cobertura tal como una placa de vidrio ópticamente plana. Las ranuras adecuadas pueden ser transformadas en microcanales herméticos soldando una placa de vidrio pulida ópticamente.

15 Las dimensiones de los microcanales son tales que el volumen de fluido que fluye a través de una ruta de flujo, es extremadamente pequeño. De acuerdo con ello, es deseable replicar los canales de flujo con objeto de facilitar la medición de la rata de flujo. La referencia citada arriba describe la producción de un dispositivo en el cual se crean 8736 rutas de flujo del mismo tamaño. El sustrato de silicio puede ser montado entonces sobre el sistema de flujo de microcanal, MC-FAN (Hitachi Haramachi Electronics Co., Ltd, Ibaragi, Japón), el cual hace posible observar directamente el flujo de elementos celulares sanguíneos a través del microcanal, bajo un microscopio conectado a una unidad de despliegue de imagen. El flujo puede ser visto continuamente mientras se determina automáticamente el tiempo de paso para un volumen dado de sangre.

20 Un valor adecuado de paso de sangre puede ser expresado como una función del tiempo de paso real de sangre completa sobre tiempo de paso de solución salina de 12 segundos a una presión de 20 cm de H₂O, como sigue:

$$\text{Tiempo de paso de sangre (valor revisado; seg)} = (\text{Tiempo de paso de sangre completa (valor real)} / \text{tiempo de paso de solución salina}) \times 12$$

Métodos de medición del flujo de sangre

25 La medición del flujo por ultrasonido de Doppler es un método ampliamente usado para la evaluación del flujo sanguíneo a través de vasos sanguíneos intactos *in vivo*. Los métodos adecuados de uso del ultrasonido de Doppler son bien conocidos para aquellos expertos en la técnica, e incluyen aquellos descritos en "Measurement of blood flow by ultrasound: accuracy and sources of error." por R. W. Gill (Ultrasound Med Biol. 1985 Jul-Ago; 11(4):625-41).

30 Breve descripción de los dibujos

Ahora se ilustrará, pero no se limitará, la invención mediante los siguientes ejemplos, y con referencia a los dibujos acompañantes, en los cuales:

35 Figura 1: representa ejemplos de curvas dosificación-respuesta de % de inhibición de agregación versus concentración de solución de inhibidor generada por (a) compuesto 1; (b) compuesto 5; (c) compuesto 9; (d) compuesto 18; (e) compuesto 23; y (f) compuesto 30 como se discutió en el ejemplo 1. (a) y (b) representan curvas de dosificación-respuesta de % de inhibición de agregación mediada por ADP. (c) y (d) representan curvas dosificación-respuesta de % inhibición de agregación mediada por colágeno. (e) y (f) representan curvas dosificación-respuesta de % inhibición de agregación mediada por ácido araquidónico.

40 Figura 2: define un método preferido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para hacer extractos de fruta como se discutió en el ejemplo 2.

Figura 3: es un cromatograma HPLC de jarabe producido usando el método detallado en el ejemplo 2. En el cromatograma se enumeran los compuestos bioactivos.

Figura 4: define un método preferido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para hacer extractos de fruta bajos en azúcar, como se discutió en el ejemplo 3.

45 Figura 5: es un cromatograma HPLC de jarabe producido usando el método detallado en el ejemplo 3. En el cromatograma se numeran los compuestos bioactivos.

50 Figura 6: % de cambio de la línea base de agregación en respuesta a diferentes agonistas de plaquetas, 3 horas después del consumo de extracto de tomate (TE) o suplementos de control (C), como se describe en el ejemplo 4. Los agonistas de plaqueta usados fueron adenosin difosfato (ADP) 7.5 $\mu\text{mol/L}$ y 3 $\mu\text{mol/L}$, y colágeno 5 mg/L y 3mg/L. En la gráfica se indican diferencias significativas entre TE y suplementos C (P < 0.001). N = 9 para todas las mediciones.

Figura 7. Muestra los tiempos promedio de cierre registrados en la línea base (0), t=3 horas (3) después de la suplementación con TE o C y t=5 horas (5) después de la suplementación con TE o C, como se describió en el ejemplo 6. n = 3 para cada grupo. Las diferencias significativas entre C y TE son indicadas en la gráfica mediante * (P = 0.011).

5 Ejemplo 1

La presente invención se basa en investigación adicional que fue conducida en vista de la actividad contra las plaquetas identificada en el extracto de fruta descrito en el documento WO 99/55350.

Se realizaron exhaustivos experimentos en los que se fraccionaron adicionalmente extractos de tomate para identificar compuestos dentro de tales extractos, que estuvieran ligados a sus efectos inhibidores sobre la agregación de plaquetas. Se identificaron muchos, muchos compuestos (no todos identificados químicamente; y no todos los datos presentados aquí) con el extracto de fruta que no tenían o tenían efectos despreciables sobre la agregación de plaquetas. Sin embargo, fue sorprendente hallar que 32 compuestos con notable actividad cayeron dentro de las clases de sustancias químicas definidas por el extracto del segundo aspecto de la invención. Este descubrimiento condujo a desarrollar los métodos del primer aspecto de la invención, con objeto de que la actividad de tales compuestos pudiera mantenerse/enriquecerse en extractos de fruta.

1.1. Métodos

1.1.1 Preparación de un extracto de tomate como se definió en el documento WO 99/55350.

Se preparó un extracto de tomate usando como material de partida pasta de tomate de ruptura en frío disponible comercialmente de 28 - 30 °Brix (es decir 28 - 30 % de sólidos, p/p) que tenía un índice de pardeamiento (absorbancia de una solución de concentración de 12.5 g de sólidos solubles/ L a 420 nm) < 0.350 AU. Se diluyó la pasta (1:5) con agua ultrapura y mediante filtración centrífuga se retiró la materia de partículas grandes, seguida por clarificación usando un separador Westfalia MSB-14 (un clarificador de disco centrífugo) a temperatura ambiente. Se retiró entonces la materia de partículas pequeñas, mediante microfiltración a una temperatura no superior a 45 °C, para dar una solución clara de color paja que no contenía sólidos insolubles de centrifugación y capaz de pasar a través de un filtro de 0.2 µ sin pérdida de sólidos solubles. Se concentró esta solución mediante evaporación hasta un jarabe de 65 °Brix, usando condiciones cuidadosamente controladas y una temperatura no superior a 50 °C para limitar el progreso de reacciones de pardeamiento no enzimático. Se incorporó un paso de pasteurización instantánea (T = 105 °C por 3 segundos) al comienzo del procedimiento de evaporación. El producto final fue caracterizado por un índice de pardeamiento < 0.600 AU, y un recuento microbiano total en placa de < 1000.

30 1.1.2 Enriquecimiento del extracto de tomate con los compuestos activos de interés, y retiro de materiales inactivos

Con objeto de rendir un material de partida más concentrado en componentes bioactivos, se retiraron los azúcares del producto descrito anteriormente, como sigue.

Se preparó una columna de resina de 130L que contenía resina FPX66 (Rohm and Haas) y se llevó al equilibrio en agua ultrapura a 4 °C. Se diluyó el material descrito en 1.1.1 hasta aproximadamente 8 Brix con agua ultrapura, y se pasó a través de la columna de resina a una rata de flujo de aproximadamente 260L / minuto, manteniendo la temperatura a 4 °C. Se descartó el permeado de la columna. Una vez pasó a través de la columna todo el material requerido, se pasó a través de ella un lavado con agua de aproximadamente 130L y se descartó. Después de ello, se realizó elución a los compuestos que habían sido retenidos por la resina, pasando 130L de agua caliente (75 °C) a través de las columnas, seguido por 130L de etanol al 80%, seguido por 130L adicionales de agua caliente. Se retuvo todo el material eluido y se combinó para dar aproximadamente 400L de solución etanólica de aproximadamente 25% que contenía los compuestos de interés.

Se concentró la solución diluida que contenía los compuestos de interés, mediante ósmosis inversa usando membranas Trisep ACM5 a temperaturas alrededor de 30 °C. El solvente etanol/agua pasó a través de esta membrana, mientras todos los compuestos disueltos allí permanecieron en la membrana. Una vez la solución diluida había sido concentrada 10 veces, es decir el volumen había sido reducido a 40 - 50L, comenzó la diafiltración, durante la cual se añadió agua ultrapura al retentado a una rata igual a la rata de retiro de permeado. De este modo, se redujo gradualmente la concentración de etanol de la solución, de 25% a < 5%.

Se secó entonces por atomización la solución etanólica a ~ 15 - 20% de sólidos, usando un secador por atomización Anhydro para formar un polvo dorado fino de contenido de humedad < 6%. Este fue el extracto de tomate enriquecido final, el cual fue usado para aislar los componentes de interés contra plaquetas.

1.1.3 Aislamiento y caracterización de compuestos bioactivos individuales en el extracto de tomate

Se preparó una solución madre de 50 mg/mL a partir del polvo seco descrito en 1.1.2, disolviéndolo en agua

- ultrapura grado HPLC. Se llevó a cabo HPLC semipreparativa usando una columna semipreparativa Luna C18(2) de 5 μ , 100 x 4.6 mm, insertando 100 μ L en la columna, en una vez. Usando un recolector de fracción, se dividieron en tres porciones los componentes que absorben UV presentes en el extracto de tomate. La fracción 1 contenía mayormente nucleósidos y nucleótidos. La fracción 2 contenía mayormente glicósidos /ésteres de ácido fenólico, y ácidos fenólicos. La fracción 3 contenía mayormente flavonoide glicósidos y flavonoides. Se secaron las tres fracciones mediante secado por congelación y se disolvieron nuevamente en agua para dar soluciones de 50 mg/mL. A su vez, cada fracción fue sometida entonces a HPLC semipreparativa adicional usando la misma columna pero con diferentes gradientes, adaptados a la polaridad y características de elución de cada fracción. De cada fracción se recolectaron hasta 10 fracciones individuales o mixtas, usando un recolector de fracción.
- 5
- 10 Se secaron por congelación las fracciones individuales y se disolvieron nuevamente en 1 mL de agua pura. Mediante HPLC-MS analítica se examinó entonces cada fracción, usando una columna analítica Luna C18(2) de 3 μ , 100 x 4.6mm, corriendo un gradiente de acetonitrilo /ácido fórmico. Se determinaron las características de cada fracción aislada, mediante recolección de su espectro UV mediante un detector de arreglo de diodos, y por examen de sus iones característicos generados por electroatomización MS en modo ion positivo.
- 15 Donde fue necesario, se llevaron a cabo purificaciones finales (por ejemplo para retirar contaminantes menores), mediante HPLC adicional. Se secaron por congelación y almacenaron congelados los compuestos finalmente purificados. Se prepararon soluciones madre a 50 mg/mL y se diluyeron en amortiguador HPLC para producir 6 niveles de concentración, los cuales fueron usados para calibrar el método HPLC, de modo que pudieron calcularse los factores de respuesta para cada compuesto individual. Estas curvas de calibración y factores de respuesta
- 20 fueron usados entonces para cuantificar los compuestos presentes en el extracto de tomate. En la tabla 3 se muestran los tipos estructurales/identidades de los compuestos bioactivos aislados.

1.1.4 Métodos de ensayo de actividad de inhibición de agregación de plaquetas

- El protocolo experimental descrito abajo fue ideado para determinar los valores IC50 de compuestos aislados, como se describe en 1.1.3. Se realizaron bioensayos crudos *in vivo* para evaluar la inhibición de agregación de plaquetas, sobre algunos extractos crudos (datos no mostrados) para ayudar a seleccionar fracciones/compuestos finos identificados mediante HPLC respecto a actividad funcional. Se consideró necesaria esta aproximación para evitar la necesidad de ensayar todos y cada uno de los compuestos (que podrían ser miles) en los extractos de fruta.
- 25

- Un valor IC50 representa la cantidad de un compuesto, en mg, requerida para inhibir en 50% la agregación de plaquetas inducida bajo condiciones estandarizadas en 1 mL de plasma rico en plaquetas, en comparación con muestras de control.
- 30

En la tabla 4 se da la actividad de los 32 compuestos más activos.

Flebotomía y muestras de sangre

- Se recolectó sangre para estudios *in vitro* a partir de voluntarios humanos saludables libres de fármacos, tanto masculinos como femeninos, con edad 18 - 60 años, con función normal de plaquetas. Los sujetos declararon que no habían consumido fármacos o suplementos conocidos por afectar la función de plaquetas, por un mínimo de 10 días antes de suministrar una muestra de sangre. La sangre fue recolectada después de punción venosa individual en una vena antecubital a través de agujas siliconizadas dentro de tubos de recolección de sangre plásticos con citrato (Sarstedt Monovettes, concentración final de citrato de sodio, 13 mmol/L). Toda la sangre fue mantenida a 37 °C desde el momento de toma de muestra de la misma.
- 35

- 40 Preparación de plasma rico en plaquetas

Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación de sangre con citrato por 15 minutos a 200 x g, y se ajustó con plasma pobre en plaquetas a un número estándar de plaquetas de $320 \pm 20 \times 10^9$ /L antes del uso. Se utilizó PRP para mediciones de la función de plaquetas, dentro de dos horas.

Agonistas de plaquetas

- 45 Para las mediciones de función de plaquetas se usaron los siguientes agonistas. Adenosin difosfato (ADP), concentración final 10 μ mol/L; colágeno, concentración final 5 mg/L; ácido araquidónico, concentración final 500 U/L (todos de Helena Biosciences, Sunderland, Reino Unido); péptido activador de receptor de trombina (TRAP), concentración final 25 nmol/L (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido). Los agonistas fueron preparados a partir de soluciones madre inmediatamente antes del uso, diluyendo en solución salina fisiológica caliente (0.9% NaCl).

- 50 Preparación de soluciones de inhibidor de plaquetas

Se prepararon inhibidores de plaqueta individuales a una concentración de entre 500 g/L y 100 g/L en solución salina fisiológica, metanol ultra-puro o DMSO ultrapuro (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) y se almacenaron

congelados hasta que se requirió. Se diluyeron entonces soluciones madre con solución salina fisiológica, inmediatamente antes del uso.

Incubación de inhibidores de plaquetas con PRP

5 Se incubaron 450 μ L de PRP con 50 μ L de solución diluida de inhibidor a 37 °C por 10 minutos, en ependorrfs de baja retención. Se diluyeron las soluciones inhibitoras tal que la concentración final de metanol o DMSO en la muestra de PRP nunca excedió 2%. Simultáneamente se incubaron muestras adecuadas de control, que contenían 50 μ L de solución salina fisiológica igualada para contenido de metanol o DMSO según fuera apropiado. Para cada compuesto inhibidor, se usaron 5 concentraciones de incubación; como estándares se usaron concentraciones finales de 0.05 mg/mL, 0.10 mg/mL, 1.00 mg/mL, 5.00 mg/mL y 10 mg/mL.

10 Medición de la agregación de plaquetas e inhibición de agregación

Después de la incubación con inhibidores de plaquetas, se transfirieron muestras de PRP a celdas de vidrio y se realizó seguimiento a la extensión de agregación inducida por ADP, colágeno, TRAP o ácido araquidónico durante 10 minutos sobre un medidor de agregación de plaquetas (PACKS 4, Helena Biosciences, Sunderland, Reino Unido). Se corrió una muestra de control con cada conjunto de muestras. A partir de las curvas de agregación generadas, se calculó el área bajo la curva para cada muestra de PRP, y se calculó la inhibición de agregación lograda a cada concentración de inhibidor, comparando el área bajo la curva para estas muestras de PRP con la de la muestra de control. Se expresó la inhibición de agregación como % de inhibición, comparado con un control, y a partir de los 6 puntos de datos obtenidos por cada compuesto inhibidor, se construyó una curva dosificación-respuesta. Se usó entonces esta curva para predecir el valor IC50 para aquel compuesto inhibidor, como se muestra en 1.2, Resultados, y Figura 1.

Para cada muestra de sangre obtenida, pudieron generarse curvas de dosificación-respuesta de 6 puntos para 2 diferentes compuestos inhibidores. Se repitieron estos experimentos de modo que para cada compuesto inhibidor, se obtuvieron por lo menos 3 (más frecuentemente 7 - 10) diferentes valores IC50 en diferentes días, usando sangre de diferentes sujetos (esto aplica a cada agonista de interés). Se tomó entonces un promedio de los diferentes IC50s y se consignaron estos valores en 1.2, Resultados, Tabla 4.

1.2 Resultados

En la tabla 3 se resumen las propiedades fisicoquímicas de los 32 compuestos, de los que se halló tenía la máxima actividad contra las plaquetas (véase abajo).

Tabla 3: propiedades fisicoquímicas de compuestos bioactivos identificados en extractos de fruta

Grupo	ID de compuesto	Compuesto bioactivo	RT (s)	λ máx	Masa/iones característicos (modo POS)
Nucleósidos	1	Citidina	1.24	275	487,244
	2	Adenosina	3.17	260	268, 136
	3	Uridina	2.59	270	267, 113
	4	Guanosina	3.9	260 (278sh)	284, 152
Nucleótidos	5	Adenosina 3'-monofosfato	1.6	260	348, 136
	6	Adenosina 5'-monofosfato	1.78	260	348, 136
Glicósidos de ácido fenólico	7	Glicósidos mixtos de ácido fenólico	8.0 -9.0		mezcla
	8	Ácido p-cumárico hexosa / derivado de ácido quínico	9.02	300	469,147,119
	9	Ácido cafeico glucósido	9.39	290	319,163
	10	Ácido ferúlico hexosa	9.67	295,315	265,177
Grupo	ID de compuesto	Compuesto bioactivo	RT (s)	λ máx	Masa/iones característicos (modo POS)

Glicósidos de ácido fenólico	11	Ácido p-cumárico hexosa / mezcla de dihidrokaempferol hexosa	10.6 2	265	467, 449, 287; 450,163
	12	Ácido p-cumárico / ácido cafeico conjugado, glicosilado	11	285	367, 344, 163, 147
	13	Ácido ferúlico glicósido	11	285,315	379, 196, 177
	14	Ácido clorogénico	12.7	325,300sh	163,377
Derivados de éster fenólico	15	Derivado de ácido p-cumárico	11.5	275	396, 196, 163
	16	Dímero de ácido cafeoil-quinico #1	14.9 6	310	
	17	Dímero de ácido cafeoil-quinico #2	26.6 3		573, 814, 163
Ácidos fenólicos	18	Ácido cafeico	13.3	325, 295	163
	19	Ácido p-cumárico	18.1	235,310	165, 147, 119
	20	Ácido benzoico	22.3		
	21	Ácido ferúlico	22.6		177
	22	Ácido cinámico	30.2	273	621, 599.5, 131.1
Flavonoide glicósidos	23	Quercetina-3-O-glicósido	23.5	275	400,303
	24	Kaempferol glicósido	24.7		592,535
	25	Quercetina-3-O-trisacáridos	25.4		765, 453, 303
	26	Naringina	25.8	285, 330	621, 563
	27	Rutina	27.2	260, 350	633, 303
Derivados de éster de flavonoide	28	Conjugado de flavonoide	24.3		258
	29	Trazas de flavonoides + glicósidos	27.5 - 30.0		mezcla
Flavonoides	30	Quercetina	36.5	255, 370	629, 303, 273
	31	Kaempferol	44.5	260, 370	287
	32	Naringenina	35.1		

5 La tabla 4 suministra datos IC₅₀ (para la inhibición de agregación de plaquetas) para los 32 compuestos identificados en el extracto de tomate. Se probó la actividad como se describe en el método 1.1.4. La figura 1 suministra ejemplos de curvas respuesta-dosificación de % de inhibición de agregación mediada por ADP versus concentración de solución de inhibidor, generada por (a) un nucleósido (citidina); (b) un nucleótido (adenosina 3' monofosfato); (c) un ácido fenólico glicósido (ácido cafeico glucósido); (d) un ácido fenólico (ácido cafeico); (e) un flavonoide glicósido (quercetina-3-O-glicósido); y (f) un flavonoide (quercetina).

Tabla 4: actividad contra las plaquetas de compuestos identificados en extractos de fruta

Grupo	ID de compuesto	Compuesto bioactivo	IC ₅₀ ADP	IC ₅₀ colágeno	IC ₅₀ TRAP	IC ₅₀ AA
Nucleósidos	1	Citidina	2.42	10.66	39.03	39.03
	2	Adenosina	0.4	0.82	>50	-
	3	Uridina	6.51	15.99	>50	-
Grupo	ID de compuesto	Compuesto bioactivo	IC ₅₀ ADP	IC ₅₀ colágeno	IC ₅₀ TRAP	IC ₅₀ AA

Nucleósidos	4	Guanosina	0.25	0.53	26.07	0.91
Nucleótidos	5	Adenosina 3'-monofosfato	0.12	0.28	24.51	2.41
	6	Adenosina 5'-monofosfato	0.12	0.28	24.51	2.41
Glicósidos de ácido fenólico	7	Glicósidos mixtos de ácido fenólico	N/A	N/A	N/A	N/A
	8	Ácido p-cumárico hexosa / derivado de ácido quínico	10.25	9.88	1.61	0.19
	9	Ácido cafeico glucósido	10.16	8.22	0.8	0.23
	10	Ácido ferúlico hexosa	12.61	14.16	0.52	0.46
	11	Ácido p-cumárico hexosa / mezcla de dihidrokaempferol hexosa	11.1	14	0.56	0.31
	12	Ácido p-cumárico / ácido cafeico conjugado, glicosilado	12.61	13.18	0.25	0.2
	13	Ácido ferúlico glicósido	13.11	14.56	0.37	0.41
	14	Ácido clorogénico	10.08	10.11	1.1	0.77
Derivados de éster fenólico	15	Derivado de ácido p-cumárico	14.65	15.18	0.35	0.26
	16	Dímero de ácido cafeoil-quínico #1	31.55	35	11.12	0.3
	17	Dímero de ácido cafeoil-quínico #2	32.96	33.07	12.16	0.2
Ácidos fenólicos	18	Ácido cafeico	18.98	11.37	8.03	7.33
	19	Ácido p-cumárico	13.22	14.62	12.82	10.18
	20	Ácido benzoico	25.11	17.74	18.19	15.45
	21	Ácido ferúlico	18.67	13.9	14.65	9.94
	22	Ácido cinámico	22.14	24.6	12.92	0.22
Flavonoide glicósidos	23	Quercetina-3-O-glicósido	25.18	28.43	12.06	0.19
	24	Kaempferol glicósido	>50	>50	N/A	N/A
	25	Quercetina-3-O-trisacáridos	>50	>50	18.61	0.46
	26	Naringina	28.1	29.55	9.13	0.31
	27	Rutina	35.21	32.18	8.96	0.41
Derivados de éster de flavonoide	28	Conjugado de flavonoide	27.68	27.22	13.67	0.23
	29	Trazas de flavonoides + glicósidos	N/A	N/A	N/A	N/A
Flavonoides	30	Quercetina	>50	>50	19.66	3.66
	31	Kaempferol	>50	>50	26.18	5.18
	32	Naringenina	>50	>50	33.21	10.41

1.3 Conclusiones

Se probaron varios compuestos hallados en extractos de tomate y se estableció que los 32 compuestos identificados en las tablas 2 y 3 tenían eficacia para prevenir la agregación de plaquetas. Además, se concluyó que de los 32 compuestos aislados y que mostraron tener capacidad contra la agregación, 16 de estos compuestos eran los más importantes para la bioactividad total. En la tabla 1 se muestran estos 16 compuestos.

En particular fue sorprendente encontrar que los compuestos bioactivos pudieron ser agrupados en (a) compuestos fenólicos (y ésteres y derivados de glicósido de ellos); (b) flavonoides (y ésteres y derivados de glicósido de ellos) y (c) nucleótidos/ nucleósidos. Esto conduce a notar que existen dos nuevas clases de compuestos (los fenólicos y flavonoides), los cuales tienen un efecto inhibitor en la agregación de plaquetas.

De estos compuestos, el más anti-agregatorio de los compuestos no fenólicos fue AMP. La modificación del nucleósido por residuos de azúcar y fosfato tuvo el efecto de aumentar sustancialmente el comportamiento contra la agregación. Esto fue sorprendente, dado que trabajo previo había identificado citidina y adenosina como constituyentes contra las plaquetas, pero no nucleótidos.

5 De los compuestos derivados de ácido fenólico identificados, los más anti-agregatorios sobre todos fueron las formas glicosiladas de ácido p-cumárico y ácido cafeico. Estos compuestos glicosilados mostraron potencial contra la agregación marcadamente más alto en respuesta a todos los agonistas tratados, comparados con los ácidos libres no glicosilados. Esta es la primera vez que se reporta tal relación estructura-función. De acuerdo con ello, los compuestos fenólicos glicosilados representan las moléculas bioactivas con máxima preferencia que pueden estar presentes con los extractos de acuerdo con la invención y que deberían mantenerse/enriquecerse en extractos preparados de acuerdo con el método del primer aspecto de la invención.

10 Se hizo un hallazgo similar respecto a los derivados flavonoides. Los glicósidos u otros derivados conjugados de quercetina y naringenina fueron marcadamente más anti-agregatorios que los aglicones flavonoides. Esto fue particularmente notable en respuesta a agonistas de TRAP y ácido araquidónico, pero también aplicó a agonistas de ADP y colágeno. Mientras se ha reportado una cantidad (muy limitada) de estudios estructura-función en la literatura para los aglicones flavonoides libres, no se conocen estudios comparando aglicones y moléculas conjugadas. De acuerdo con ello, los compuestos flavonoides glicosilados representan también moléculas bioactivas de máxima preferencia que pueden estar presentes en los extractos de acuerdo con la invención y que deberían mantenerse/enriquecerse en los extractos preparados de acuerdo con el método del primer aspecto de la invención.

15 Es interesante notar que cuando se reduce la relación de AMP a adenosina, la bioactividad total del extracto desciende. Se halla que lo mismo sucede cuando desciende la relación de ácido fenólico glicósidos /ésteres a ácido fenólico libre, y cuando la relación de flavonoide glicósidos a flavonoides libres desciende.

20 Vale la pena notar que en 1.1.3 se divulga una forma simple de producir un extracto de fruta de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. Un extracto preparado de acuerdo con los métodos divulgados en el documento WO 99/55350 puede ser fraccionado para aislar tres fracciones de las que se identificó que tienen actividad contra las plaquetas. La fracción 1 contenía mayormente nucleósidos y nucleótidos. La fracción 2 contenía mayormente glicósidos /ésteres de ácido fenólico, y ácidos fenólicos. La fracción 3 contenía mayormente flavonoide glicósidos y flavonoides. Estas tres fracciones pueden ser recombinadas entonces (fracción 1 + 2 + 3) para suministrar un extracto de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, el cual tiene sorprendente eficacia.

25 Ejemplo 2

En vista del conocimiento ganado respecto a los compuestos activos en extractos de tomate, se procedió a desarrollar métodos de procesamiento de frutas para producir extractos en los cuales se mantuviera la actividad de los compuestos y/o en los cuales se enriqueciera la concentración de tales compuestos activos.

35 Después de muchos experimentos, se estableció que la metodología de acuerdo con el primer aspecto de la invención era óptima para producir extractos enriquecidos en un número significativo de los compuestos activos identificados en el ejemplo 1.

40 Habiendo establecido esta metodología, se procedió a desarrollar un proceso que pudiese ser usado a escala industrial de los métodos de la invención, para producir un jarabe que pudiera ser usado en la fabricación de productos farmacéuticos o alimenticios (bebidas o alimentos).

En la figura 2 se ilustra el proceso para hacer tal jarabe y representa una realización preferida del primer aspecto de la invención.

45 Los jarabes preparados de acuerdo con el proceso de la figura 2 representan un extracto con máxima preferencia de acuerdo con el segundo aspecto de la invención y tienen las propiedades definidas en la tabla 2 (véase arriba) y también la tabla 5.

Tabla 5: Composición de un extracto de tomate de máxima preferencia de acuerdo con el segundo o tercer aspectos de la invención.

Parámetro de especificación	Especificación
Materia seca (°Brix)	60 a 63
Densidad (g/cm3)	1.15 a 1.22
pH (a 4°Brix)	3.90 a 4.15

ES 2 621 793 T3

Indice de pardeamiento (a 4°Brix)	<0.70
Carbohidratos totales (g/100g)	58 a 70
Pectina (g/100 g)	33 a 40
Azúcares reductores (g/100 g)	22 a 30
Proteína (g/100 g)	4 a 6
Aminoácidos libres (g/100 g)	2 a 3.5
Compuestos bioactivos (g/100g)	3.0 a 4.0
Recuento viable total (UFC/mL)	<1,000
Salmonella (UFC/25 mL)	Ausente
Listeria monocytogenes (UFC/25 mL)	Ausente
Staphylococcus aureus (UFC/mL)	Ausente
Enterobacteria (UFC/mL)	<10
Levaduras y moldes (UFC/mL)	<1,000

El jarabe puede contener hasta 70% de azúcares simples (glucosa, fructosa y sacarosa) sobre materia seca y puede contener hasta 50% de agua.

5 Los jarabes de máxima preferencia producidos usando este método contienen 32 componentes bioactivos, que están numerados en el cromatograma HPLC mostrado en la figura 3 y corresponden a los compuestos numerados identificados en la tabla 1-4 y discutidos en el ejemplo 1.

En la tabla 6 (abajo) se suministran algunas características adicionales de los jarabes, que son importantes en la optimización de su bioactividad. Los números de compuesto se refieren al cromatograma mostrado en la figura 3 y los compuestos identificados en la tabla 1-4.

10 Tabla 6

ID de compuesto	Especificación
Compuestos 2 - 6	> 2.00 mg/g
Compuesto 8	> 0.05 mg/g
Compuesto 9	> 0.07 mg/g
Compuesto 10	> 0.03 mg/g
Compuesto 11	> 0.30 mg/g
Compuesto 12	> 0.20 mg/g
Compuesto 13	> 0.16 mg/g
Compuesto 14	> 0.13 mg/g
Compuesto 15	> 0.10 mg/g
Compuesto 23	> 0.05 mg/g
Compuesto 25	> 0.16 mg/g
Compuesto 26	> 0.74 mg/g
ID de compuesto	Especificación
Compuesto 27	> 0.60 mg/g
Compuestos 18, 19 & 21	< 1.50 mg/g

Relación de Compuesto 5: Compuesto 2	>3 .0
Glutamina	> 8.00 mg/g
Derivados de furfural	< 0.15 mg/g

5 Se reconoció que las características delineadas en la tabla 6 fueron importantes en la optimización de actividad contra las plaquetas de extractos de acuerdo con la invención. Los extractos más preferidos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención tienen estas propiedades. Además, estas características pueden ser usadas como medidas de control de calidad en las realizaciones más preferidas de los métodos del primer aspecto de la invención. Por ello, estas características son puntos de control particularmente útiles cuando se producen extractos en una escala industrial.

Ejemplo 3

10 También se desarrolló un proceso que podría ser usado en el paso a escala industrial de los métodos de la invención, para la producción de un extracto de fruta bajo en azúcar en la forma de un polvo. El polvo puede ser usado también en la manufactura de productos farmacéuticos o alimenticios (bebidas o productos alimenticios).

En la figura 4 se ilustra un proceso para la producción de tal polvo y representa una realización preferida del primer aspecto de la invención.

15 Los extractos preparados de acuerdo con el proceso de la figura 4 representan un extracto preferido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención y tienen las propiedades definidas en la tabla 2 (véase arriba) y también la tabla 7.

Tabla 7: Composición de un extracto de tomate bajo en azúcar de máxima preferencia de acuerdo con el segundo o tercer aspectos de la invención

Parámetro de especificación	Especificación
Materia seca (% p/p)	94 a 96
Densidad aparente (g/cm ³)	0.25 a 0.30
pH (en agua a 4°Brix)	3.5 a 3.8
Índice de pardeamiento (en agua a 4°Brix)	<3.00
Carbohidratos totales (g/100g)	<0.1
Pectina (g/100 g)	-
Azúcares reductores (g/100 g)	< 0.1
Proteína (g/100 g)	< 0.01
Aminoácidos libres (g/100 g)	30 a 37
Compuestos bioactivos (g/100g)	50 a 60
Recuento viable total (UFC/mL)	<1,000
Salmonella (UFC/25 mL)	Ausente
Listeria monocytogenes (UFC/25 mL)	Ausente
Staphylococcus aureus (UFC/mL)	Ausente
Enterobacteria (UFC/mL)	<10
Parámetro de especificación	Especificación
Levaduras y mohos (UFC/mL)	<1,000

20 El polvo puede contener menos de 1% de azúcares simples en materia seca (glucosa, fructosa y sacarosa) y puede contener < 6% de agua. El extracto de polvo enriquecido contiene típicamente hasta 60% de compuestos bioactivos.

Los extractos producidos usando este método contienen también hasta 33 diferentes componentes bioactivos, que están numerados en el cromatograma HPLC mostrado en la figura 5 y corresponden a los compuestos numerados identificados en las tablas 1-4 y como se discutió en el ejemplo 1.

5 En la tabla 8 se dan algunas características adicionales de estos polvos, que son importantes en la optimización de su perfil de bioactividad. El número del compuesto se refiere al cromatograma mostrado en la figura 5 y tablas 1-4.

Tabla 8

ID de compuesto	Especificación
Compuestos 2-6	> 15.20 mg/g
Compuesto 8	> 9.40 mg/g
Compuesto 9	> 3.70 mg/g
Compuesto 10	> 0.70 mg/g
Compuesto 11	> 26.10 mg/g
Compuesto 12	> 90.80 mg/g
Compuesto 13	> 85.30 mg/g
Compuesto 14	> 18.30 mg/g
Compuesto 15	> 8.60 mg/g
Compuesto 23	> 8.50 mg/g
Compuesto 25	> 14.70 mg/g
Compuesto 26	> 38.00 mg/g
Compuesto 27	> 50.70 mg/g
Compuestos 18, 19 & 21	< 38.00 mg/g
Relación compuesto 1: compuesto 3	> 3.0
Glutamina	> 52.00 mg/g
Derivados de furfural	< 0.50 mg/g

10 Se reconoció que las características delineadas en la tabla 8 fueron importantes en la optimización de la actividad contra las plaquetas, de extractos de acuerdo con la invención. Los extractos de máxima preferencia de acuerdo con el segundo aspecto de invención tienen estas propiedades. Además, estas características pueden ser usadas como medidas de control de calidad en las realizaciones de máxima preferencia de los métodos del primer aspecto de la invención. Por ello, estas características son puntos de control particularmente útiles cuando los extractos se producen en una escala industrial.

Ejemplo 4

15 En el siguiente ejemplo, se describe un experimento en el cual se probó la eficacia contra las plaquetas de una composición preparada de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 2. Se apreciará que las composiciones preparadas de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 3 podrían ser probadas siguiendo el mismo protocolo.

4.1 Protocolo de estudio

20 4.1.1 Objetivos de estudio y breve lineamiento

Este estudio cuantificó el efecto *ex vivo* contra las plaquetas, del consumo de una bebida de tratamiento que contiene 3g de jarabe de extracto de tomate (preparado de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 2), comparado con un suplemento de control, en sujetos saludables.

4.1.2 Diseño de estudio

25 Se siguió un diseño de estudio ciego sencillo. Se colocó una cánula a sujetos sometidos a ayuno y se tomó una muestra de línea base entre 07:00 y 08:00. Directamente después de la colección de la muestra de línea base, los sujetos consumieron bien sea un tratamiento (TE) o un suplemento de control. A aproximadamente t = 3 horas se tomaron muestras adicionales de sangre de la cánula. A los sujetos se ofrecieron pequeños volúmenes (25 mL) de

agua entre los momentos de toma de muestra, para evitar deshidratación.

4.1.3 Sujetos

5 Para el estudio se reclutaron 9 adultos saludables de ambos sexos. Los sujetos tenían 40 - 65 años, sin historia médica de enfermedad o desórdenes hemostáticos serios. Se evaluó la conveniencia para inclusión en el estudio, mediante cuestionarios de dieta y estilo de vida y discriminación médica, mediante la cual se obtuvo un recuento de sangre completa. No se incluyeron en el estudio individuos con bajos recuentos de hematología. Cualquier sujeto que consumiera habitualmente suplementos dietarios (por ejemplo aceites de pescado, aceite de onagra) suspendió estos suplementos por un periodo mínimo de un mes antes de participar en el estudio. Se instruyó a los sujetos de abstenerse por un periodo de 10 días antes de la participación, de consumir fármacos conocidos por 10 afectar la función de plaquetas. Se obtuvo consentimiento informado escrito de todos los sujetos, y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Grampian.

4.1.4 Flebotomía

15 Se colocaron cánulas a los sujetos reclutados en el estudio, usando una aguja de mariposa calibre 21 con silicona, para causar una disrupción mínima a la vena durante la toma de múltiples muestras de sangre. Para minimizar la activación del sistema hemostático, se especificó un máximo de tres punciones a la vena. La cánula permaneció en el sitio durante la totalidad del periodo de tiempo de estudio, y se retiraron muestras de sangre venosa de ~ 30 mL cada punto de tiempo del muestreo, descartando los primeros 2 mL en cada ocasión. Después de la colección de la muestra de sangre, se limpió la cánula con solución salina para prevenir bloqueo. Para las mediciones de función de plaquetas y tiempo de coagulación, se colectó la sangre en jeringas plásticas y se transfirió a tubos con citrato de colección de sangre (concentración final de citrato de sodio, 13 mmol/L). Para la medición de proteína C-reactiva (CRP), se tomó una muestra de sangre de línea base individual (5mL) en anticoagulante de EDTA (concentración final, 1.6g/L). Para la medición de fibrinopéptido A en cada punto de tiempo, se colectaron 4.5 mL de sangre en 0.5 mL de un anticoagulante mixto contenía EDTA, trasilol y clorometilcetona. Se incubaron muestras de sangre a 37° C en una incubadora portátil para la transferencia al laboratorio. Se descartó cualquier muestra de sangre que 25 mostrara evidencia de activación, definida como una concentración de fibrinopéptido A mayor a 6 µg/L. Se retiraron del estudio por el periodo afectado todos los voluntarios que mostraban evidencia de una elevada respuesta inflamatoria, como se evidencia por una línea base de concentración de proteína C-reactiva mayor a 6 µg/L, y se emprendió en una fecha posterior la intervención programada.

4.1.5 Estudios *ex vivo* de agregación de plaquetas

30 En cada instante de tiempo, se llevó a cabo medición de la extensión de ADP y agregación de plaquetas inducida por colágeno en plasma rico en plaquetas. Pueden usarse diferentes concentraciones de agonista para aproximar diferentes condiciones fisiológicas. Con objeto de colectar datos bajo condiciones de estimulación subóptima de plaquetas, se definió como subóptima una concentración inferior estandarizada (3 µmol/L para ADP, 3 mg/L para colágeno), mientras se definió como óptima una concentración superior estandarizada (7.5 µmol/L para ADP, 5 mg/L para colágeno). Se usaron esas concentraciones de agonista para todas las mediciones. Los efectos en la agregación de plaquetas observados después del tratamiento o intervenciones de control están expresadas como el cambio porcentual en área bajo la curva de agregación, después del consumo de extracto / placebo, comparado con valores de línea base. 35

4.1.6 Mediciones suplementarias

40 Se llevó a cabo detección de CRP de plasma elevado usando un ensayo semicuantitativo de aglutinación de látex (Dade Behring, Reino Unido), el cual detecta niveles en plasma > 6 mg/L. Este umbral es tomado como indicativo de activación aguda del sistema inflamatorio, tal como puede asociarse con infección (por ejemplo inicio de una infección viral o un resfriado) o daño (por ejemplo tendonitis). Las muestras que desplegaban signos de tal activación aguda no deberían ser usadas para estudios de función de plaquetas.

45 Se llevó a cabo medición de FPA mediante ELISA (ensayo Zymutest FPA, HyphenBioMed, Francia), sobre plasma del cual se había retirado el fibrinógeno mediante tratamientos de adsorción por bentonita. La presencia de FPA en plasma a niveles mayores de 6 µg/L fue tomada como un indicativo de activación del sistema hemostático durante la toma de muestra. Tales muestras no deberían ser usadas para la medición de función de plaquetas dado que los resultados obtenidos no serán confiables. Así, los niveles de CRP circulante y niveles de FPA en la muestra de 50 sangre, fueron usados como un indicativo de la adecuación de las muestras para mediciones de plaquetas.

4.2 Resultados

Las muestras de sangre tomadas durante este estudio no mostraron niveles de CRP circulante mayores al umbral de 6 mg/L, indicando que la activación en fase aguda no estaba presente en ningún sujeto durante los días de toma de muestra del estudio. De modo similar, en muestras de sangre tomadas para este estudio, no hubo muestras que

exhibieran niveles de FPA mayores al umbral de 6 µg/L. Así, todas las muestras de sangre recibidas fueron juzgadas como adecuadas para estudios de función de plaquetas. No se incluyen los datos de discriminación.

Los datos presentados en la figura 6 ilustran mediciones de agregación de plaquetas llevadas a cabo en la línea base (t = 0) y 3 horas después del consumo de los suplementos de tratamiento (t = 3). Los resultados se expresan como % de inhibición de capacidad de agregación de plaquetas, comparados con valores de la línea base.

4.3 Conclusiones

La figura 6 demuestra que los extractos de tomate de acuerdo con la invención dan como resultado una reducción de la línea base de agregación de plaquetas, de entre 18% y 28% para agregación mediada por ADP, y entre 3% y 12% para agregación mediada por colágeno, 3 horas después del consumo. El consumo del suplemento de control dio como resultado un cambio en la línea base de agregación, de entre 2% y 4% para agregación mediada por ADP, y aproximadamente 2% para agregación mediada por colágeno, después de 3 horas. Las diferencias entre la línea base y los puntos de tiempo de 3 horas no fueron significativas para el suplemento de control, pero fueron significativas a $P < 0.001$ para el suplemento de extracto de tomate. Las diferencias entre el control y suplementos de extracto de tomate fueron significativas también al nivel de $P < 0.001$.

Estos resultados demuestran claramente que los extractos de tomate de acuerdo con la invención son útiles para el tratamiento de condiciones caracterizadas por inapropiada agregación de plaquetas.

Además, se ha establecido que los métodos de acuerdo con la invención dan como resultado la producción de nuevos extractos de tomate con propiedades mejoradas, cuando se comparan con extractos de tomate conocidos (por ejemplo aquellos divulgados en el documento WO 99/55350). Se comparó actividad *ex vivo* contra las plaquetas, medida después de tomar extracto de tomate producido por método de procesamiento conocido, y extracto de tomate producido usando los métodos de acuerdo con la presente invención, que tenía como objetivo el mantenimiento de glicósidos y ésteres. Se halló que una dosificación individual de 3g de extracto de tomate de acuerdo con la presente invención, dio como resultado una inhibición de agregación de plaquetas inducida por 3 µmol/L de ADP de 28% comparada con la línea base, mientras extractos conocidos dieron como resultado una inhibición de agregación de plaquetas inducida por ADP de ~25% aunque esto se logra solamente mediante consumo de 9g de extracto. Así, los métodos de la presente invención parecen enriquecer los bioactivos en el extracto, en aproximadamente 3 veces. De acuerdo con ello, el empleo de los métodos del primer aspecto de la invención, da como resultado un extracto más potente y, de manera ventajosa, puede reducirse la dosificación diaria necesaria.

Ejemplo 5

Se prepararon varios productos que representan formulaciones preferidas que comprenden extractos de acuerdo con la invención.

Bebidas de yogur que contienen extractos de tomate

Los extractos de tomate preparados como se describió en los Ejemplos 2 y 3 son ambos adecuados para incorporación en una bebida de yogur. Un ejemplo de tal bebida puede ser preparado como sigue.

Debería someterse un yogur bebible, formulado sin cultivos probióticos vivos, a una pasteurización previa y enfriamiento a 4 – 8 °C. El yogur frío debería mezclarse con extracto de tomate como se preparó en el Ejemplo 2, en la relación 50:1, o con extracto de tomate como se preparó en el Ejemplo 3 en la relación 1000:1 (p/p). Debería revisarse la acidez y regularse con ácido cítrico, y debería ajustarse el sabor. Si se requiere un cultivo probiótico en el producto final, éste debería ser añadido después del ajuste, y la mezcla final debería ser empacada en botellas de consumo individual de 150g.

Cada botella de consumo individual de 150g debería entonces contener 3g de extracto de tomate preparado de acuerdo con el Ejemplo 2, o 150mg de extracto de tomate preparado de acuerdo con el Ejemplo 3. Esto representa una dosificación diaria individual. Los productos finales deberían ser almacenados a 4°C por su vida útil recomendada (típicamente entre 14 y 21 días).

Productos grasos esparcibles que contienen extracto de tomate

El extracto de tomate preparado como se describe en el Ejemplo 3, o procesado adicionalmente para dar un producto encapsulado, es adecuado para incorporación dentro de productos grasos esparcibles. Un ejemplo de tal formulación puede ser producido mediante dosificación después de la pasteurización del extracto de tomate bajo en azúcar en polvo, dentro de producto esparcible graso formulado previamente, pasteurizado y enfriado, en la relación 200:1 (p/p). La mezcla debería ser homogeneizada a elevado corte para asegurar distribución homogénea, y empacada en recipientes de varias porciones.

5 La etiqueta debería incluir la información según la cual la ingesta diaria normal de producto graso esparcible debería ser de aproximadamente 30g. El consumo de 30g de producto graso esparcible por día dará como resultado una ingesta diaria de aproximadamente 150mg de extracto de tomate, lo cual constituye una dosificación diaria individual. El producto esparcible debería ser almacenado a 4°C por la duración de su vida útil (típicamente 90 días).

Bebidas a base de jugo de frutas, que contienen extractos de tomate

Los extractos de tomate preparados como se describe en los ejemplos 2 y 3 son ambos adecuados para la incorporación dentro de bebidas a base de jugo de fruta. Un ejemplo de tal bebida puede ser preparado como sigue.

10 Diluya concentrado de jugo de naranja con agua en la relación 1:5.4. Al jugo reconstituido añada 0.1 % de esencia de toronja, 0.05% de esencia de piña y 1.2% de extracto de tomate como se produjo en el ejemplo 2. Pruebe acidez y dulzor y añada hasta 5% de ácido cítrico (regulador de acidez) y hasta 2% de sucralosa, según se requiera. Pasteurice por 90 segundos a 121°C.

15 Empaque la mezcla pasteurizada en cajas de 1L, o en cajas o botellas de dosificación individual. 250mL de la bebida final como se describió deberían contener aproximadamente 3g de extracto de tomate, equivalentes a una dosificación diaria individual. Los detalles de la etiqueta deberían contener esta información y el consejo para beber una porción de 250mL por día.

20 Otros concentrados de jugo de frutas son igualmente apropiados para el uso; de modo alternativo, pueden prepararse jugos de fruta fresca, mezclas de fruta y jugos vegetales, o mezclas que contienen cantidades variables de pulpa.

Productos encapsulados

25 Prepare una solución 50% p/p de extracto de tomate bajo en azúcar en polvo, el cual ha sido fabricado como se describió en el ejemplo 3. Eleve la temperatura a 60°C. Mezcle con un volumen igual de bien sea: una mezcla fundida y transformada en emulsión de grasas de alto punto de fusión, por ejemplo triglicéridos; una solución de polisacáridos dispersos, por ejemplo pectinas, agares; u otros polímeros adecuados. Homogenice con cuidado para asegurar la mezcla correcta. Produzca un producto encapsulado usando una técnica tal como secado por atomización con temperatura controlada, controlando el tamaño de partícula de modo que el tamaño de partícula sea < 200 μ. Según sea apropiado, antes del secado por atomización pueden añadirse a la dispersión aditivos tales como colorantes, conservantes o agentes de libre fluidez.

30 El producto encapsulado resultante debería contener entre 12% y 20% de extracto de tomate sobre una base p/p. El producto encapsulado debería ser almacenado a < 4°C, en la oscuridad, en materiales de envoltura de lámina sellados. Cuando se incorpora dentro de productos alimenticios, la dosificación del producto encapsulado debería estar en el intervalo de 400 mg - 700 mg por día.

Formulaciones en bolsita listas para disolverse

35 El extracto de tomate como se describe en el ejemplo 3 es adecuado para incorporación dentro de formulaciones de premezcla en bolsita, de porción individual lista para disolver. Un ejemplo de tal formulación puede ser preparado mediante mezcla de: 150mg de extracto de tomate bajo en azúcar, en polvo; 285g de maltodextrina; 6.5g de esencia de crema de fresa; 0.8g de sucralosa; 3.8g de ácido cítrico; 2.5g de color natural rojo remolacha; y 0.25g de caramelo. Los ~ 300g resultantes de mezcla en polvo seco pueden presentarse en una bolsita de porción individual con respaldo de lámina, adecuada para disolución en entre 50mL y 300mL de agua, al gusto. Cada 300g de mezcla contiene una dosificación diaria individual de extracto de tomate.

40 La formulación en polvo en bolsitas debería ser almacenada a temperatura ambiente y presentada con instrucciones para consumir una bolsita por día en agua.

Comprimidos

45 El extracto de tomate como se describió en el ejemplo 2 puede ser usado para preparar comprimidos para uso en suplementos farmacéuticos o dietarios, por ejemplo mediante formación de comprimidos mediante compresión directa, como sigue.

50 El extracto de tomate como se describe en el ejemplo 2 debería ser molido/triturado hasta un intervalo de tamaño de partícula de 1 – 3 μ antes de la formación del comprimido. El extracto en polvo triturado previamente debería ser mezclado en seco con un excipiente tal como celulosa microcristalina, o maltodextrina M700, para suministrar lubricación durante el proceso de compresión. Es adecuada una relación de 40% de extracto a 60% de excipiente, pero pueden usarse también relaciones de 10:90 a 60:40. Pueden añadirse también colorantes en polvo, según se

requiera.

Usando una máquina convencional de formación de comprimidos, ajustando a una presión de 1.5 - 2.0 toneladas/pulgada cuadrada, pueden producirse comprimidos de 212g de 5kg de dureza. Tales comprimidos contendrán 85mg de extracto de tomate por comprimido. Se recomienda almacenamiento en paquetes de ampollas de lámina de aluminio laminada. En tal empaque, los comprimidos serán estables al almacenamiento bajo temperaturas de hasta 45 C. Deberían tomarse dos comprimidos juntos, una vez o dos veces por día, para lograr un nivel recomendado de dosificación.

Ejemplo 6

En el ejemplo 4 se describieron los efectos directos contra las plaquetas de una composición preparada de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 2. Para ilustrar que estos efectos contra las plaquetas son de una magnitud para afectar la fluidez de la sangre o el flujo de sangre, se emprendió trabajo adicional en el cual se midieron los efectos de esta composición en la hemostasis primaria total. La hemostasis, esto es la detención del sangrado por el proceso de coagulación, ocurre en dos partes. La hemostasis primaria se refiere a la habilidad de la sangre completa para formar micro y macroagregados de plaquetas bajo condiciones de flujo, y formar un coágulo inicial de plaquetas sobre una superficie rica en colágeno (normalmente una pared de vaso sanguíneo). La hemostasis secundaria se refiere a la formación de una red de fibrina en este coágulo primario, inducida por trombina, lo cual conduce a un coágulo más permanente que toma significativo tiempo para disolverse vía fibrinólisis. La medición de hemostasis primaria arroja datos que pueden ser más relevantes fisiológicamente que los datos de agregación solos, cuando se examina la eficacia de la composición de extracto de tomate sobre la afectación de la fluidez de la sangre y así del flujo de la sangre.

En el siguiente ejemplo, se describe un experimento en el cual se probó el efecto sobre la hemostasis primaria total de una composición preparada de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 2, usando un Equipo de Análisis de Función de Plaquetas, el PFA-100®. El dispositivo de análisis de función de plaquetas se ha convertido en una herramienta útil para la medición de hemostasis primaria en muestras pequeñas de sangre. Este sistema de prueba es un instrumento controlado por microprocesador, que simula *in vitro* la fase dependiente de plaquetas de la hemostasis primaria, mientras delimita el papel de los factores reológicos. Básicamente, el sistema vigila la interacción de las plaquetas sobre membranas recubiertas con colágeno-ADP (COL-ADP) o colágeno-epinefrina (COL-EPI). Las muestras de sangre con citrato son succionadas bajo condiciones de flujo controlado (rata de corte: 4,000-5,000/s) a través de un corte con apertura de 150 micrómetros dentro de la membrana. Durante el proceso, el tapón creciente de plaquetas bloquea progresivamente el flujo de sangre a través del corte de apertura. La capacidad hemostática de las plaquetas en la muestra de sangre es indicada por el tiempo requerido para que el tapón de plaquetas ocluya la apertura (tiempo de cierre), el cual se expresa en segundos.

6.1 Protocolo de estudio

6.1.1 Objetivos del estudio y corto delineamiento

Este estudio examinó el efecto *ex vivo* sobre la hemostasis primaria en sujetos de saludables, del consumo de 3g de jarabe de extracto de tomate (preparado de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 2), comparado con un suplemento de control.

6.1.2 Diseño del estudio

Se reclutaron 6 adultos saludables con edad de 45 – 75 años, con parámetros hemostáticos normales (recuentos sanguíneos), sin historia médica de enfermedad o desórdenes hemostáticos serios, y sin consumo de suplementos dietarios o fármacos conocidos por afectar la función de plaquetas. Se obtuvo consentimiento informado escrito, y el estudio fue aprobado por el Comité de Etica de Investigación Grampian. Entre 07:00 y 08:30 se tomaron muestras de sangre de línea base (anticoaguladas con amortiguador ácido de citrato dextrosa) de sujetos que habían ayunando. Directamente después de la colección de la muestra de línea base, los sujetos consumieron tratamiento (TE) o un suplemento de control. Se tomaron otras muestras de sangre a los tiempos $t = 3$ horas, y $t = 5$ horas después de la suplementación.

6.1.5 Medición *ex vivo* de hemostasis primaria

La medición de tiempo de cierre PFA-100 en muestras de sangre completa fue llevada a cabo en cada instante de tiempo. Las mediciones fueron llevadas a cabo usando membranas de colágeno-epinefrina. Brevemente, se llevaron a temperatura ambiente cartuchos que contenían las membranas apropiadas, y se insertaron dentro del reservorio de cada cartucho 900 μ l de sangre completa anticoagulada. Se insertaron entonces inmediatamente los cartuchos dentro de la unidad de procesamiento del PFA-100. Se succionó automáticamente a elevado corte la sangre desde el reservorio a través de la membrana del cartucho, hasta que cerró la apertura de la membrana (tiempo de cierre) o por un máximo de 300s en el caso en que no se formó coágulo. Se registraron los tiempos de

cierre y se produjo una impresión. Todas las mediciones fueron llevadas a cabo mínimo 30 minutos después de la toma de muestra de sangre.

6.2 Resultados

- 5 Los tiempos promedio de cierre para cada tratamiento se presentan gráficamente en la figura 7. En esta figura se muestran los promedios registrados de tiempo de cierre para la línea base (tiempo 0 respecto a la suplementación con tratamiento (TE) o control (C)), y a 3 horas y 5 horas después de la suplementación con TE o C. $n = 3$ para cada grupo, y se analizaron los datos mediante ANOVA. Las diferencias significativas entre C y TE son indicadas en la gráfica mediante * ($P = 0.011$).

6.3 Conclusiones

- 10 Los resultados demuestran que extractos de tomate que representan composiciones de acuerdo con la invención, dan como resultado un promedio de aumento en el tiempo de cierre PFA-100 de 24 % de los valores de línea base, 3 y 5 horas después del consumo. El consumo de suplemento de control dio como resultado un descenso promedio de los tiempos de cierre de línea base de 16% después de 3 horas, y 12% después de 5 horas. Las diferencias entre la línea base y los puntos de tiempo de 3 y 5 horas no fueron significativas para el suplemento de control, pero
15 fueron significativas a $P = 0.011$ para el suplemento de extracto de tomate. Las diferencias entre los suplementos de control y de extracto de tomate, fueron significativas ($P = 0.011$).

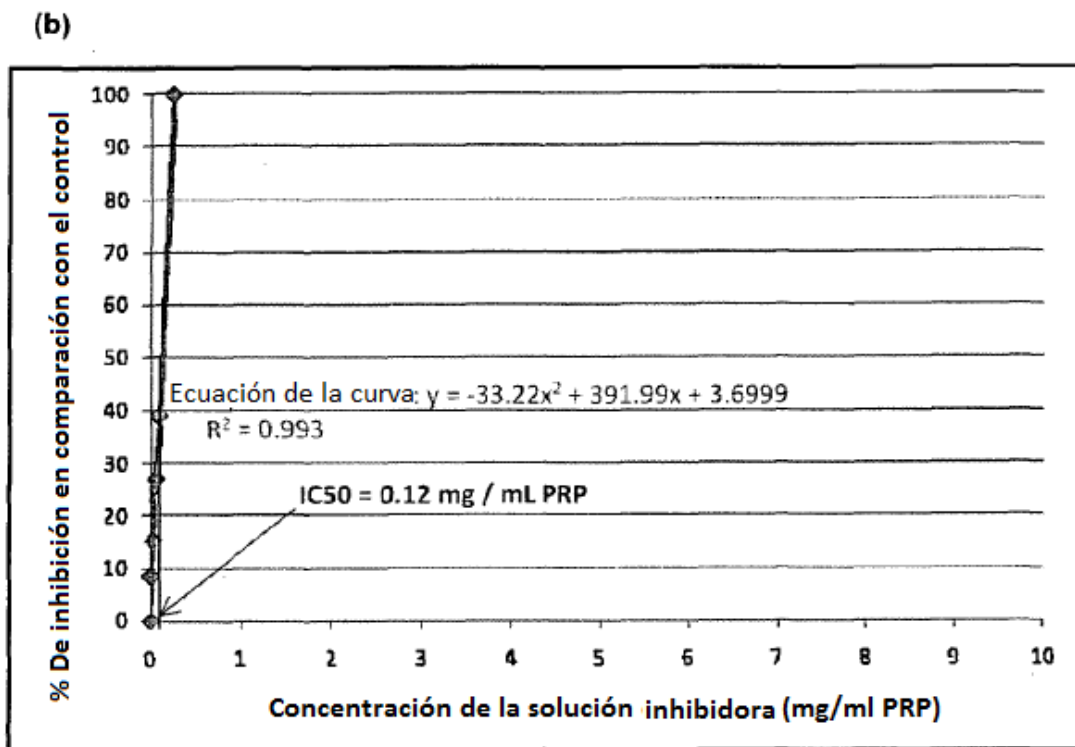
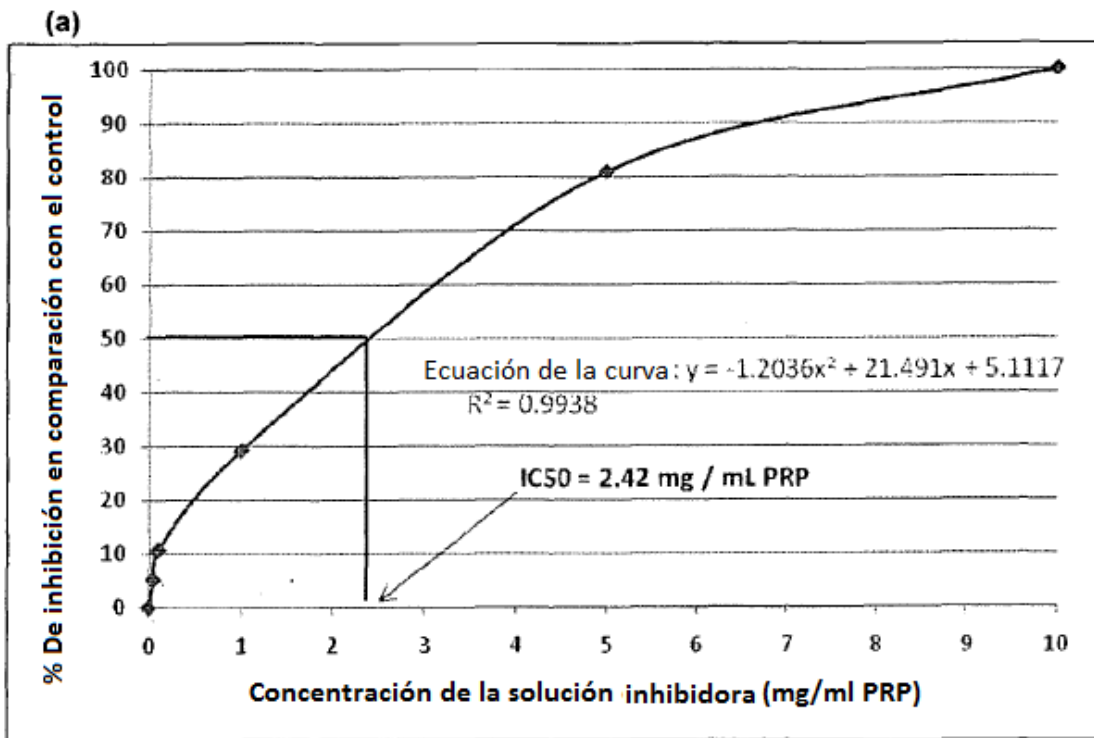
- Los resultados muestran que las composiciones de suplemento de extracto de tomate de acuerdo con la invención aumentan el tiempo tomado para que en cada apertura del cartucho se forme un coágulo de plaquetas, implicando que el potencial hemostático de plaquetas ha descendido. El mayor tiempo requerido para que un coágulo se
20 forme, refleja una mayor fluidez de la sangre.

Estos resultados demuestran claramente que las composiciones (tales como extractos de tomate) de acuerdo con la invención, son útiles en la reducción de fluidez de la sangre. Esto da soporte a su uso en la normalización del flujo sanguíneo.

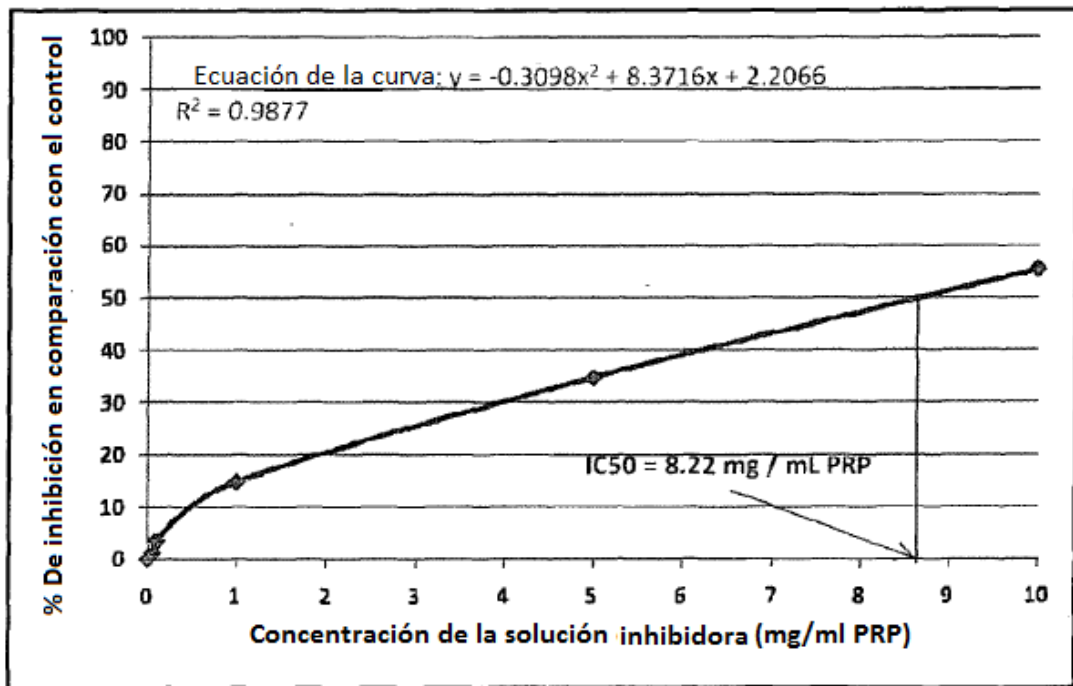
Reivindicaciones

1. Un método para fabricar un extracto de fruta de tomate, en el que la fruta de tomate es procesada para optimizar la actividad de inhibición de agregación de plaquetas del extracto, que comprende los pasos de:
 - (a) preparación de una mezcla de partida de fruta homogeneizada;
 - 5 (b) separación de una fracción soluble en agua de sólidos de fruta;
 - (c) filtración de la fracción soluble en agua para hacer al extracto sustancialmente libre de licopeno; y
 - (d) concentración de agentes activos en el permeado de filtración, usando un evaporador
 en el que el extracto tiene un índice de pardeamiento de < 0.8 AU, un pH de 4.0-4.3 y una densidad de 1.15-1.20.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el índice de pardeamiento del mix de partida, definido como la absorbancia a 420 nm de la porción soluble, no excede 0.4 AU a 4% de sólidos.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el paso (b) separa la fracción de sólidos solubles con tamaño de partícula > 500 µ.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el paso (c) da como resultado una solución que pasará a través de un filtro de 0.2 µ sin pérdida de sólidos.
- 15 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye un paso adicional después del paso (c) para el retiro de azúcares libres del extracto soluble en agua.
6. Un extracto de fruta de tomate sustancialmente libre de licopeno, que comprende:
 - (a) ácido fenólico o un éster fenólico glicosilados, o derivados de ellos
 - (b) un flavonoide glicosilado; y
 - 20 (c) un nucleósido
 en el que el extracto tiene un índice de pardeamiento de < 0.8 AU, un pH de 4.0-4.3 y una densidad de 1.15-1.20.
7. El extracto de fruta de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el ácido fenólico o un éster fenólico glicosilado es un ácido cinámico glicosilado o derivado del mismo y puede ser seleccionado del grupo que comprende ácido cafeoil-4-O-quinico, cafeoil-4-O-glucósido, cumaroil-4-O-glicósido (gluc / gal) y cumaroil-4-O- glicósido (disacárido).
- 25 8. El extracto de fruta de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el ácido fenólico o un éster fenólico glicosilado es seleccionado del grupo que comprende ácido cafeico glucósido; ácido p-cumárico hexosa / dihidrokaempferol hexosa; ácido ferúlico glicósido; y un derivado de ácido p-cumárico.
9. El extracto de fruta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8 en el que el flavonoide glicosilado es quercetina - 3 -O-glucósido o rutina.
- 30 10. El extracto de fruta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-9 en el que el nucleósido es seleccionado del grupo que comprende AMP, uridina, adenosina, guanosina o GMP.
11. El extracto de fruta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-10 en el que el extracto comprende cada uno de los 16 compuestos identificados en la tabla 1; o cada uno de los 32 compuestos identificados en la tabla 2.
- 35 12. Un extracto de fruta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 - 11, para uso en el tratamiento o prevención de una condición médica, caracterizada por inapropiada agregación de plaquetas.
13. Un extracto de fruta de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el tratamiento o prevención de la condición médica caracterizada por inapropiada agregación de plaquetas es para un propósito seleccionado del grupo que consiste en: mantenimiento de la salud cardíaca mediante reducción de agregación de plaquetas; beneficio de la circulación; y normalización del flujo sanguíneo.
- 40

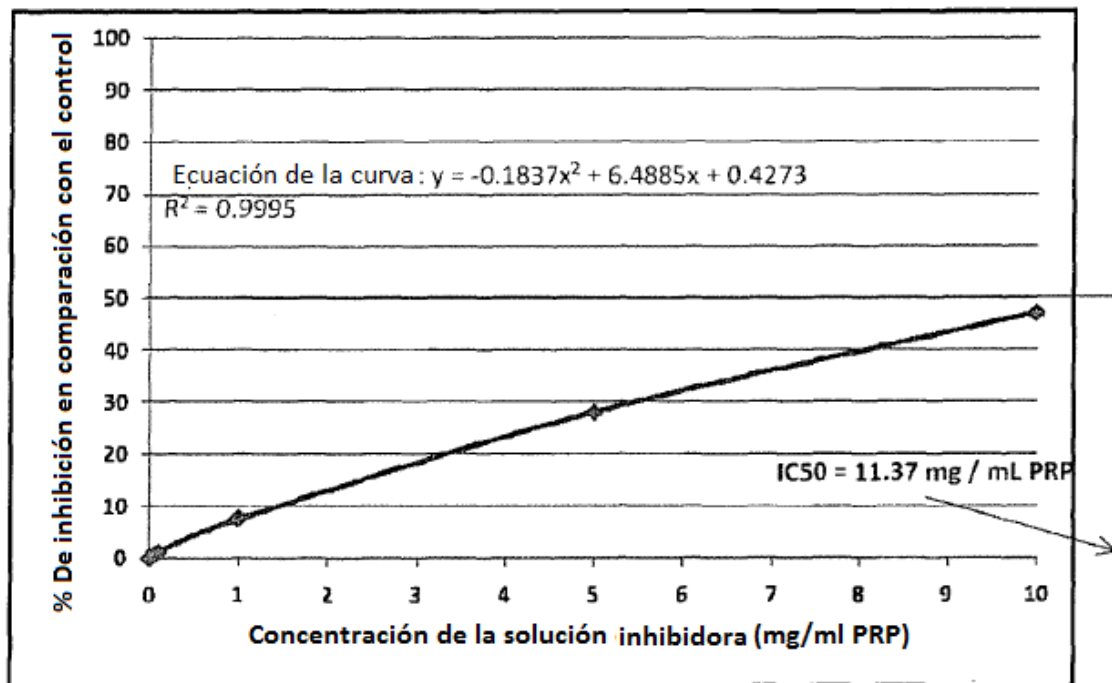
FIGURA 1



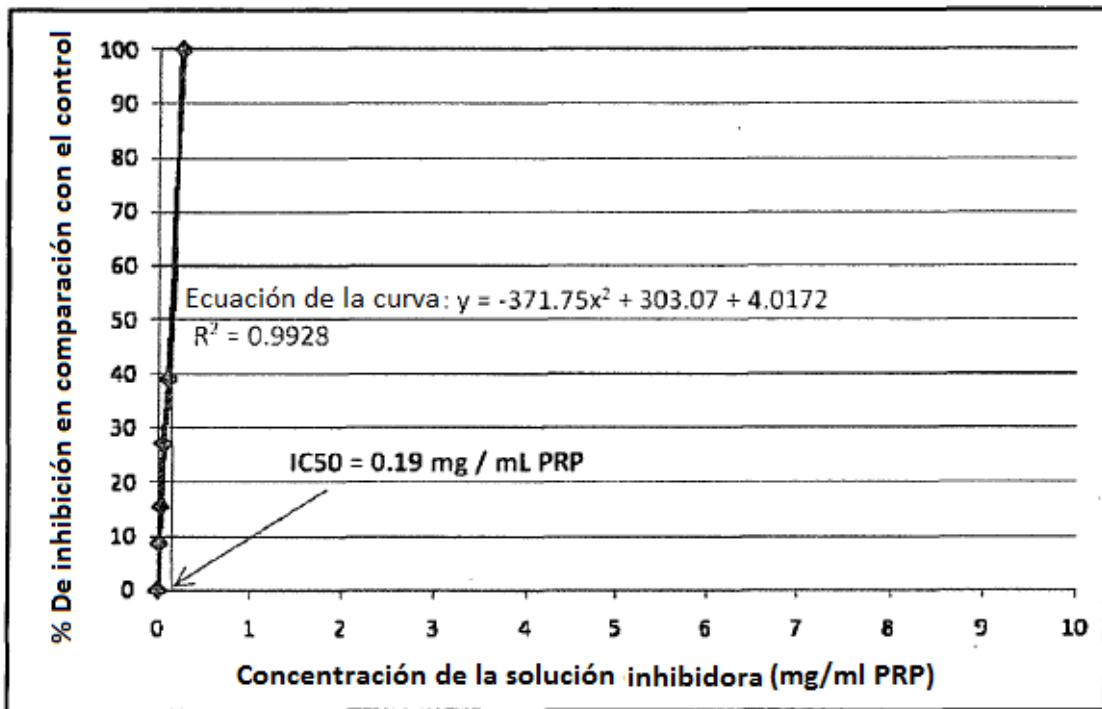
(c)



(d)



(e)



(f)

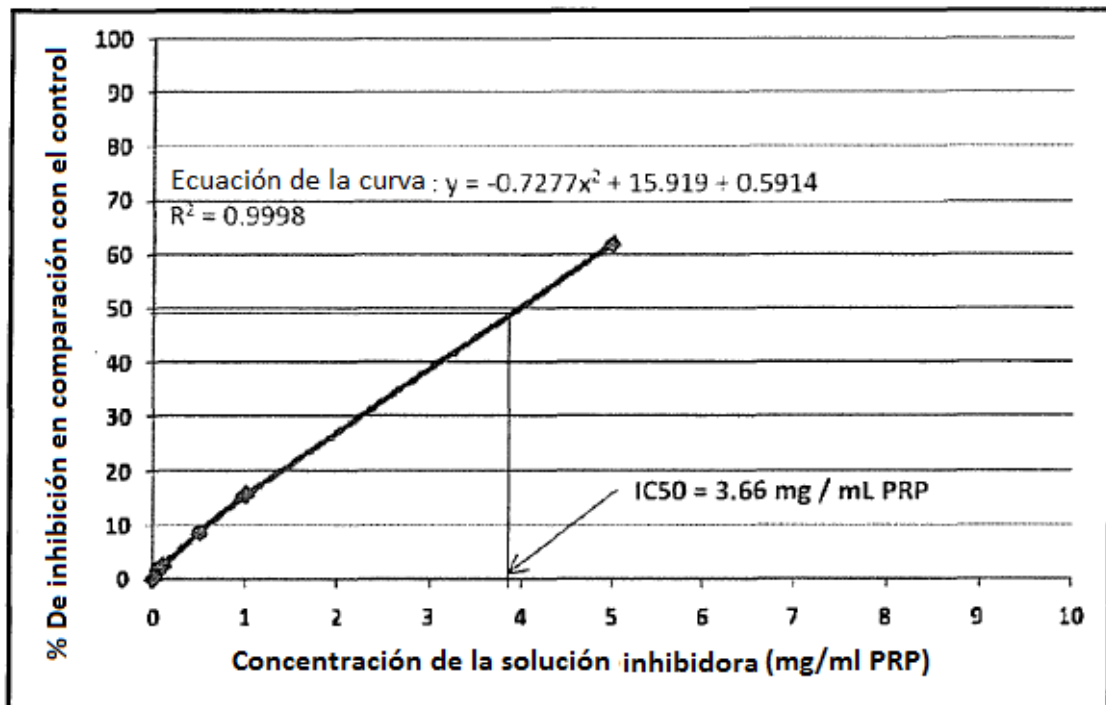


FIGURA 2

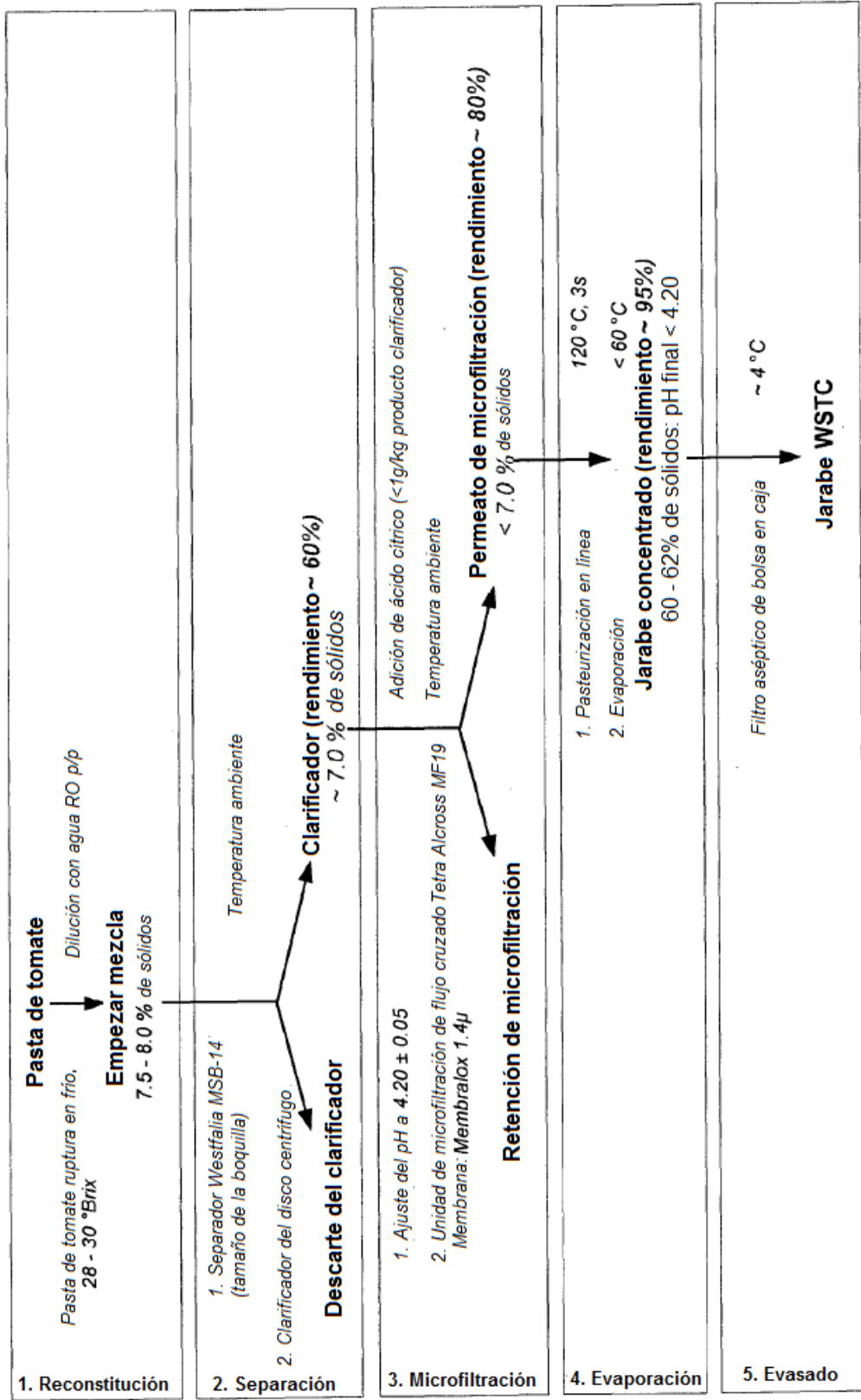


FIGURA 3

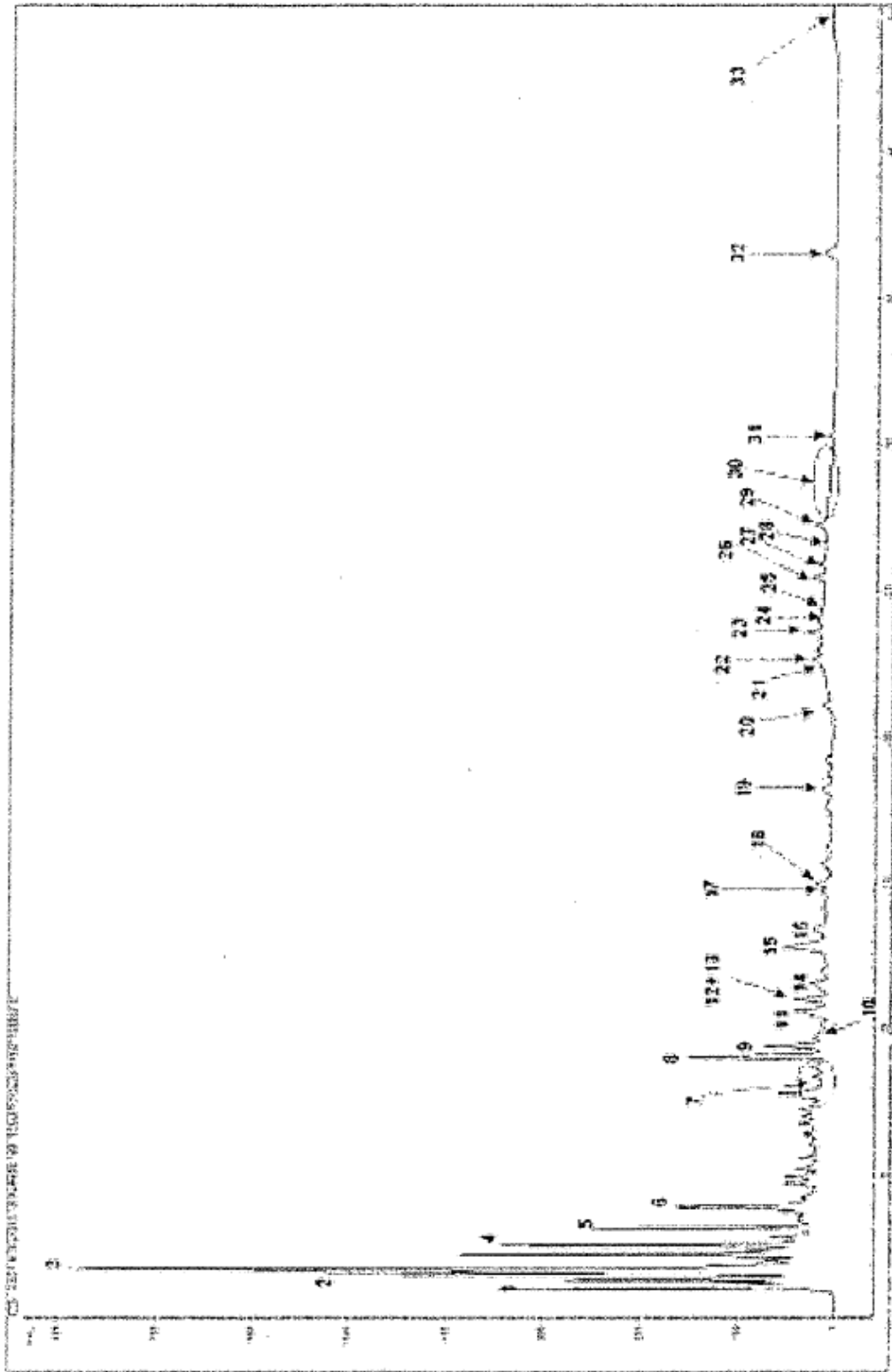
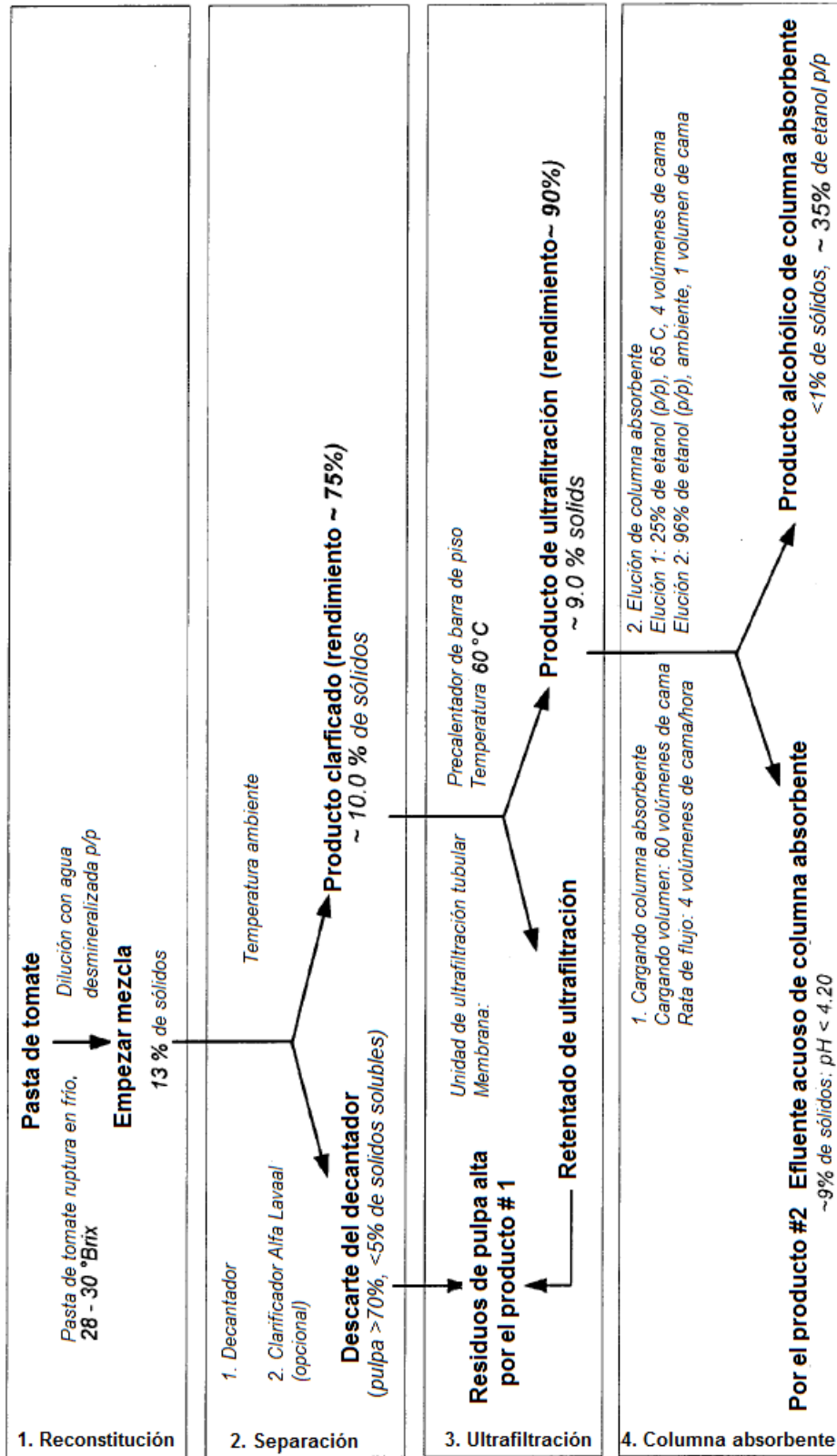


FIGURA 4



(continua en la hoja 7/10)

FIGURA 4

(continuación de la hoja 6/10)

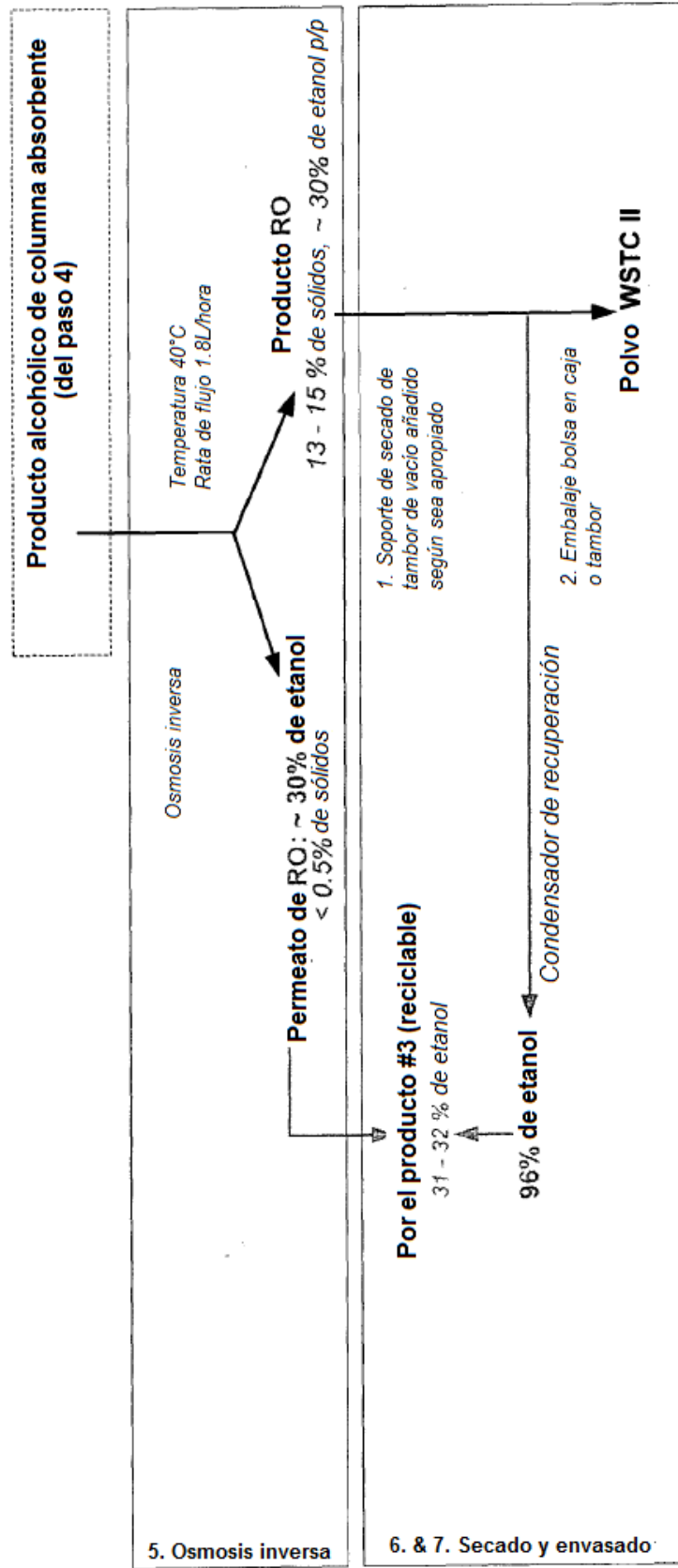


FIGURA 5

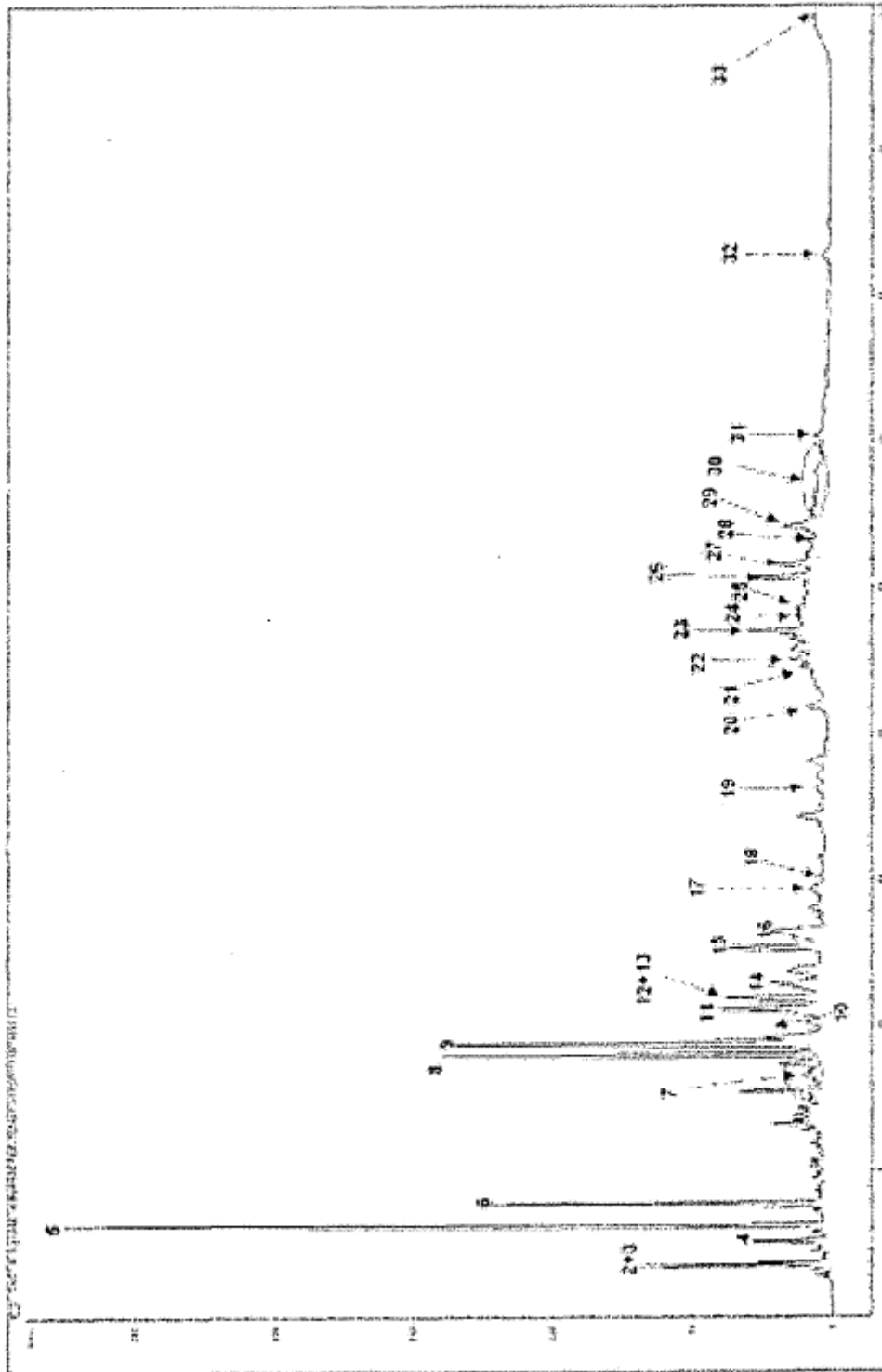


FIGURA 6

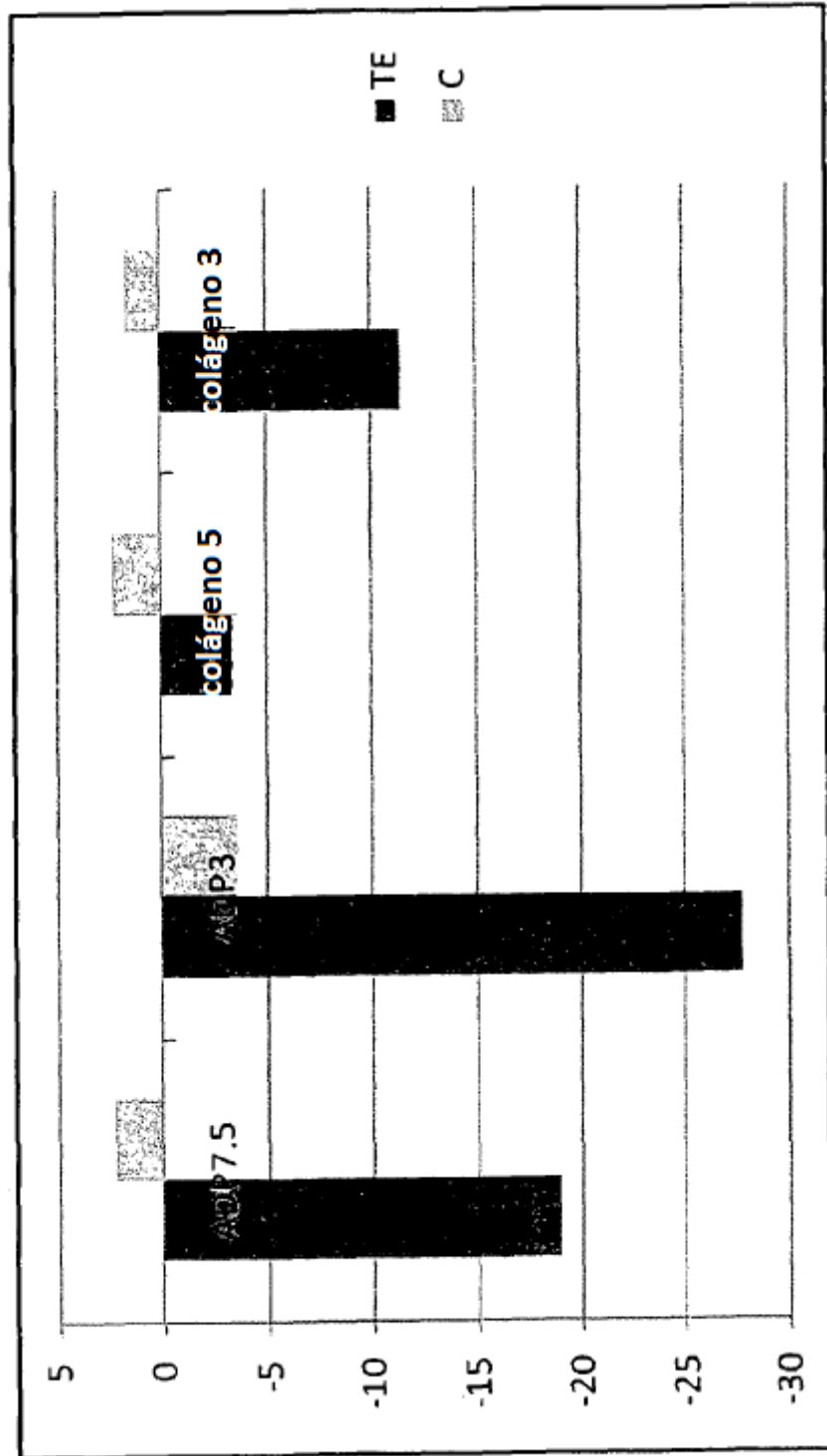


FIGURA 7

