(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 663 405**

(51) Int. CI.:

A61K 31/352 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 36/87 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2011 PCT/EP2011/058282**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11147754**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2011 E 11721514 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2575843**

(54) Título: **Procedimiento para la preparación de un extracto enriquecido a partir de hojas de Vitis vinífera L.**

(30) Prioridad:

28.05.2010 EP 10164316

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2018

(73) Titular/es:

SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH (100.0%)
Brüningstraße 50
65929 Frankfurt am Main, DE

(72) Inventor/es:

SCHEURING, UWE;
LANGER, MARTIN;
PLOHMANN, BERND;
FEISTEL, BJOERN y
WALBROEL, BERND

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de un extracto enriquecido a partir de hojas de *Vitis vinífera L.*

La presente invención se refiere a extractos de hojas de *Vitis vinífera L.*, a su preparación y a su uso.

Bajo la denominación debilidad venosa se entiende coloquialmente un cuadro patológico en el que se producen depósitos de agua en los miembros inferiores y que se manifiesta por perturbaciones del estado de ánimo tales como piernas pesadas y rápidamente cansadas. La denominada retención de agua en las piernas designa una acumulación edematosa de agua en el tejido y presupone el que se desborde agua de los vasos sanguíneos. Según ello, se ha de asumir que la permeabilidad de los vasos aumenta de manera desmesurada.

La debilidad venosa puede considerarse como un estadio temprano de la insuficiencia venosa crónica (CVI). La CVI, también denominada síndrome de retención crónico-venoso o insuficiencia crónica de las venas, se basa en un trastorno de la microcirculación de los vasos como consecuencia de una obstrucción venosa. El riesgo de padecer una insuficiencia venosa crónica aumenta con la edad, la obesidad, una anamnesis con inflamaciones venosas, trombosis venosa profunda y traumatismo grave de las piernas. La CVI se manifiesta en mujeres con una frecuencia doble a la de hombres.

Lo importante para la formación de una insuficiencia venosa-crónica es la existencia de una hipertensión patológica de las venas superficiales. Normalmente, ésta se encuentra en 20 - 30 mm de Hg, pero mediante trombosis venosa, válvulas venosas patológicas primarias o secundarias o bomba muscular debilitada, aumenta a 60 - 90 mm de Hg. Esta hipertensión provoca las modificaciones anatómicas, fisiológicas e histológicas de los vasos, responsables de las posteriores complicaciones. Bajo condiciones fisiológicas, el lecho capilar es protegido frente a fuertes variaciones de presión, dado que las arteriolas pre-capilares se pueden contraer por medio de reflejos. Sin embargo, pacientes con una presión venosa crónicamente elevada parecen haber perdido este reflejo, es decir, en el caso de variaciones de la posición corporal las variaciones de presión son transmitidas directamente al lecho capilar.

En el caso de una presión venosa continuamente incrementada resultan variaciones que afectan a las paredes de los capilares. A ellas pertenecen un ensanchamiento y una prolongación del lecho capilar, una superficie incrementada del endotelio, un depósito incrementado de colágeno IV en la membrana basal y un depósito pericapilar de fibrina. La cooperación de presión venosa incrementada y capilares anormales con una permeabilidad incrementada conducen a un arrastre de agua, proteínas grandes y glóbulos rojos al intersticio. La fibrina que se acumula parece también poder ser disuelta menos fácilmente. Al mismo tiempo, se produce un intercambio reducido de gases, es decir, una hipoxia cutánea. Esto conduce, entre otros, a una activación de los leucocitos.

Un proceso similar se conoce de la reacción de fase aguda de inflamaciones. En este caso, la permeabilidad de las paredes de los vasos se ve incrementada durante unos pocos minutos por mediadores de los vasos tales como histamina, prostaglandinas (p. ej. PGE-2), quininas y serotonina. Desencadenantes típicos de una reacción de fase aguda de este tipo son citoquinas tales como interleuquina-1 (IL-1β), interleuquina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), factor de crecimiento tumoral beta (TGF-β) o interferón-gamma que, entre otros, son liberados por células del endotelio, fibroblastos, macrófagos, granulocitos y linfocitos. Estas células inmunocompetentes liberan las citoquinas, por ejemplo, después de la lesión o la muerte de células contiguas. Las citoquinas acceden a través del torrente sanguíneo al hígado en donde, junto con cortisol, estimulan al órgano para la producción de aproximadamente 30 proteínas de fase aguda (APP) diferentes. Las APPs favorecen los procesos de cicatrización y actúan en contra de la lesión del tejido. Los efectos de la reacción de fase aguda son tanto locales como también sistémicos. Los efectos locales han de delimitar posibles infecciones y eliminar xenobióticos (por ejemplo colorantes producidos de forma sintética, plaguicidas y disolventes clorados). Las células muertas o dañadas se eliminan a través de fagocitosis y se inician procesos de reparación. Por el contrario, los efectos sistémicos son reacciones de defensa que han de garantizar la supervivencia del organismo completo, por ejemplo frente a endotoxinas.

De manera correspondiente a las directrices de la Sociedad Alemana de Flebología (Registro de directrices AWMF Nº 037/009) como agentes fármaco-terapéuticos adyuvantes en el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica se emplean, entre otros: ácido acetilsalicílico, diuréticos, fibrinolíticos (Defibrotide, Estanazolol, Sulodexida), potenciadores de la fibrinolisis, Iloprost, pentoxicilina, prostaglandina E1, saponinas (extractos de Centella, Hippocastanus, Ruscus), benzarona, dobesilato cálcico, naftazona, tribenósido, Ginkgo biloba, así como numerosas sustancias que pertenecen al gran grupo de los flavonoides [Havsteen BH, the biochemistry and medical significance of the flavonoids, Pharmacol Ther 2002; 96(2-3); 67-202]. Se pudo detectar un efecto claramente positivo de los flavonoides sobre el desarrollo del edema [Martínez MJ, Bonfill X, Moreno RM, Vargas E, Capellá D. Phiebotonics for venous insufficiency. Cochrane Database of Systematic Reviews 2005, Número 3. Art. Nº: CD003229. DOI: 10.1002/14651858. CD003229.pub2.].

Se ha demostrado que en regiones vinícolas el cuadro patológico de la debilidad venosa se produce en un grado claramente menor. Esto sugiere que en la planta *Vitis vinífera L.* deben estar contenidos compuestos que actúen de forma antagonista sobre la enfermedad. Tradicionalmente, las hojas de vid se comían tanto como verdura como también se utilizaron médicamente en forma de decocciones e infusiones en el caso de trastornos menopáusicos o para el tratamiento de hemorroides. En la Farmacopea Francesa se aconseja un extracto a base de hoja de vid roja como tónico venoso. Desde hace algunos años se encuentran en el comercio bajo el nombre Antistax® preparados con un extracto acuoso a base de hoja de vid roja que se emplean con éxito en el caso de insuficiencia crónica-venosa (CVI) [Kiesewetter H, Kosciency J, Kalus U, Vix JM, Peil H, Petrini O, et al. Efficacy of orally administered extract of red vine leaf AS 195 (folia vitis viniferae) in chronic venous insufficiency (stages I-II). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arzneimittel-Forschung* 2000;50(2):109-117]. El extracto contenido en la misma se caracteriza por un contenido de aproximadamente 5% de flavonoides. Como otro grupo de compuestos fenólicos están contenidos aproximadamente 0,1% de antocianos.

De manera correspondiente a la buena compatibilidad de los extractos de hojas de vid hasta ahora conocidos, el objetivo de la presente invención era proporcionar un nuevo extracto que se adecúe igualmente para un uso en la gama completa de enfermedades inflamatorias. Efectos antiinflamatorios locales pueden ser de ayuda eventualmente a lo largo de todo el tracto gastrointestinal en el caso del tratamiento o la profilaxis de enfermedades inflamatorias. La gingivitis, parodontitis, estomatitis, esofagitis y gastritis describen las enfermedades inflamatorias de la parte superior del tracto digestivo. La colitis linfocitaria, colitis ulcerosa y morbus Crohn son los representantes más conocidos de enfermedades inflamatorias de la zona intestinal.

Por hemorroides se entiende coloquialmente la hinchazón o bien el ensanchamiento similar a las varices o también en forma de nudo de una almohadilla vascular arterio-venosa que se encuentra entre el recto y el esfínter del ano. Esta almohadilla vascular se denomina también plexo hemorroide. Se compone de un entramado de arterias y venas que, junto con el esfínter, posibilitan el cierre preciso del ano. Cuando se habla de hemorroides se quiere dar a entender con ello, la mayoría de las veces, dolores hemorroidales. Síntomas típicos son ligeras hemorragias, sensación de presión, prurito, erupción cutánea y en el estadio avanzado problemas en el caso de le evacuación controlada de gases intestinales y de heces. Los motivos pueden ser, entre otros, aneurismas similares a varices de vasos sanguíneos próximos al ano. Una enfermedad similar con la denominación trombosis perianal (= falsa hemorroides) resulta de la formación de un coágulo sanguíneo (trombo) en las venas de la piel anal y se denomina también trombosis anal. Las trombosis perianales resultan a menudo por estar sentado durante largo tiempo, sentarse sobre superficies frías, una presión intensa o prolongada durante la defecación (p. ej. en el caso de heces duras), así como durante el embarazo y el nacimiento. Pueden ser provocadas también por una tos fuerte, una carga corporal, deficiencia de líquidos por beber demasiado poco o incluso por el estornudo. También en este caso, los vasos sanguíneos pueden ser dilatados más allá de la medida habitual. Tanto en el caso de dolores hemorroidales como también en el caso de la trombosis perianal, junto a medidas quirúrgicas es también habitual la administración de supositorios con principios activos analgésicos o antiinflamatorios (directriz con respecto a dolores hemorroidales www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/081-007p.htm y directriz con respecto a la trombosis anal www.derma-de/585.0.html).

Estado de la técnica

Para otras partes de la planta de *Vitis vinífera L.*, por ejemplo de las pepitas, se han descrito ya algunos métodos de enriquecimiento. Mientras que procedimientos tales como la extracción por microondas (documento CN 1102589C) procuran sin embargo sólo escasos factores de enriquecimiento mediante un rendimiento incrementado, extracciones con fluidos supercríticos (documento CN 1107110C) sólo son adecuados para estructuras lipofílicas. El documento CN 1454896 utiliza una extracción primaria de carácter ácido en unión con una extracción líquido-líquido para el enriquecimiento de proantocianidinas oligoméricas. El documento EP 348781 describe un procedimiento de enriquecimiento para compuestos fenólicos oligómeros a base de pepitas de uva mediante una filtración en membrana, mientras que los documentos WO 2005036988 y EP 1909750 reivindican un procedimiento cromatográfico para el enriquecimiento selectivo de polifenoles y el empobrecimiento de monómeros.

El documento GB 934554 describe una extracción alcohólica-acuosa (EtOH al 50-80%) de hoja de vid roja, así como una subsiguiente acidificación para obtener el color rojo. Para la separación de clorofila y el crecimiento se propone una extracción líquido-líquido mediante benceno o tetracloruro de carbono, alternativamente una precipitación en agua pura. Mediante la separación de sales se puede acelerar la precipitación de los taninos. A ello sigue una etapa de purificación a través de una extracción líquido-líquido con butanol o pentanol. A partir de la fase del extracto alcohólico resultante se precipita una fracción de procianidina opcionalmente con éter, petróleo o benceno, y a continuación se seca de forma cuidadosa (en vacío o en una torre de pulverización). Este procedimiento es muy complejo y costoso y el producto resultante tiene desviaciones muy intensas del extracto de referencia. Por lo tanto, se busca un proceso de preparación alternativo que permita una preparación más económica.

Misión de la presente invención era proporcionar extractos activos alternativos de hojas de vid.

El problema se resuelve mediante un procedimiento para la preparación de un extracto a partir de hojas de *Vitis vinífera L.*, que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar un fármaco a base de hojas de *Vitis vinífera L.*
b) extracción del fármaco con un eluyente elegido de agua y mezclas de agua con alcohol, obteniéndose un extracto bruto,
c) separación del extracto bruto del fármaco extraído,
d) separación al menos parcial del eluyente, obteniéndose un extracto espeso,
e) retro-disolución del extracto espeso en agua,
f) separación de componentes insolubles,
g) enriquecimiento selectivo de sustancias constitutivas secundarias de la planta mediante
    i. una extracción de 2 fases o
    ii. ultrafiltración en membrana.

De acuerdo con la invención se emplean hojas de *Vitis vinífera L.* Éstas pueden emplearse, en principio, verdes o secadas.

Se prefiere que las hojas sean desmenuzadas antes de la extracción.

En una forma de realización especial de la presente invención, la provisión del fármaco tiene lugar mediante la recogida de hojas de *Vitis vinífera L.* en un momento en el que se alcanza un óptimo en el contenido de flavonoides, el secado y el desmenuzamiento de las hojas, así como opcionalmente mediante corte en trozos de las hojas.

La extracción tiene lugar con agua o mezclas de agua con alcohol, con el fin de obtener un extracto bruto. Particularmente adecuadas son cantidades de 5 a 30 kg de agente de extracción por cada 1 kg de fármaco secado.

Preferiblemente, como eluyente se emplea agua o una mezcla de etanol y agua que contiene 5 a 95% (v/v) de etanol.

Particularmente preferido es el empleo de un eluyente que, junto a agua, contenga etanol en una cantidad de 25 a 50% (v/v).

Preferiblemente, la extracción se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 40 a 80º, habiéndose acreditado particularmente un intervalo de temperaturas de 15 a 25ºC por debajo de la temperatura de ebullición del eluyente utilizado.

La presión que reina en la extracción no es crítica a lo largo de amplios intervalos. Habitualmente, la extracción se llevará a cabo, sin embargo, a una presión en el intervalo de 900 a 1500 mbar, preferiblemente de 950 a 1100 mbar y, en particular, a la presión ambiente, es decir, a aproximadamente 1013 mbar.

El extracto bruto es separado del fármaco extraído. La separación tiene lugar habitualmente mediante filtración u otros procedimientos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, se adecua una filtración a través de un placa perforada de tamiz con agujeros de 4 mm y bolsas de tamiz de poliamida dispuestas a continuación con una anchura de malla de 250 µm. Otros procedimientos adecuados para ello son conocidos por el experto en la materia.

A continuación, el eluyente se separa del extracto bruto, al menos en parte, obteniéndose un extracto espeso. Por una separación parcial del eluyente se ha de entender en el marco de la presente invención una separación del eluyente de 30 a 99% (v/v) referido al volumen de eluyente empleado, preferiblemente a 75 a 98% (v/v) y en particular una separación esencialmente completa del eluyente, es decir, una separación de al menos 95% (v/v). Habitualmente, el eluyente se separará mediante calentamiento y/o a presión reducida. Métodos y dispositivos adecuados para ello son conocidos por el experto en la materia.

El extracto espeso, así obtenido, se vuelve a disolver en agua y se separan los componentes insolubles.

Habitualmente, la retro-disolución tiene lugar en una cantidad de 1 parte a 10 partes de agua, referida a una cantidad de 1 parte del extracto bruto obtenido. Los componentes insolubles se separan mediante métodos habituales en la técnica tales como filtración y/o centrifugación.

A continuación, tiene lugar un enriquecimiento selectivo de sustancias constitutivas secundarias de las plantas mediante una extracción en 2 fases o una filtración en membrana.

La extracción en 2 fases puede llevarse a cabo en forma de una extracción en fase sólida, habiéndose acreditado como fase sólida una resina adsorbente. Resinas adsorbentes adecuadas están comercialmente disponibles, por ejemplo, del grupo de los copolímeros de divinilbenceno hidrofóbicos no iónicos, polímeros de ésteres alifáticos y polímeros de formofenol bajo las denominaciones Amberlite®, Levatite®, Montech® y Diaion®. Las resinas adsorbentes adecuadas para el procedimiento de acuerdo con la invención se caracterizan preferiblemente por un tamaño de poros interno medio en el intervalo de 300 - 700 Angström, preferiblemente de 400 - 500 Angström.

Las sustancias que se unen al adsorbente se eluyen y se continúan utilizando; las sustancias no unidas se desechan.

Habitualmente, la extracción se llevará a cabo en un intervalo de temperaturas de 10 a 30ºC. La solución del problema utilizada se ajusta habitualmente entre pH 3 y pH 6, preferiblemente entre pH 4,5 y pH 5,5, de manera particularmente preferida a pH 5.

En el caso de la extracción en 2 fases puede tratarse también de una extracción líquido-líquido, siendo preferiblemente la segunda fase un líquido no miscible con agua y eligiéndose del grupo de los alcoholes, cetonas, alcanos o ésteres. En una forma de realización especial, la segunda fase es un alcohol no miscible con agua, preferiblemente un alcohol C_4-C_5 y de manera particularmente preferida n-butanol. En este caso, se continúa utilizando la fracción que se transfiere a la segunda fase, y se desecha la fase acuosa.

Habitualmente, la extracción se llevará a cabo con un contenido en sustancia seca de la solución de partida entre 3 y 30%, preferiblemente entre 10 y 20%, de manera particularmente preferida de 15%.

Básicamente, en el caso del enriquecimiento selectivo se puede tratar también de una filtración en membrana, habiéndose acreditado membranas con un tamaño de exclusión de 30 a 2000 kilodalton (kDa).

El material permeado se continúa utilizando, mientras que el material retenido se desecha.

En una forma de realización especial de la presente invención se secará el extracto después del enriquecimiento selectivo efectuado, obteniéndose un extracto seco de *Vitis vinífera L.* El secado tiene lugar utilizando procedimientos habituales en la técnica tales como, p. ej., el secado en cinta por pulverización. Sin embargo, es asimismo posible continuar utilizando el extracto enriquecido sin un secado previo.

Mediante el procedimiento de acuerdo con la invención precedentemente descrito se obtienen extractos de *Vitis vinífera L.*, cuya relación de fármaco nativo a extracto (DEVnativo) asciende a 12 : 1 hasta 40 : 1. El contenido total en flavonoides de los extractos obtenidos conforme a la invención y de acuerdo con la invención asciende habitualmente a al menos 15% en peso, preferiblemente a al menos 20% en peso, y el contenido en antocianos asciende a al menos 0,1% en peso, preferiblemente a al menos 0,2% en peso, de manera particularmente preferida a al menos 0,3% en peso. Con ello se alcanza una inhibición potenciada de las citoquinas que desencadenan la permeabilidad en comparación con el extracto de referencia (conforme al estado de la técnica).

Por consiguiente, otro objeto de la presente invención es el extracto preparado según uno de los procedimientos precedentemente descritos.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un preparado de extracto que contiene un extracto de acuerdo con la invención, así como al menos un coadyuvante fisiológicamente compatible. Coadyuvantes fisiológicamente compatibles adecuados son conocidos por el experto en la materia.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de un extracto de acuerdo con la invención o de un preparado de extracto de acuerdo con la invención para la preparación de medicamentos, preparados farmacéuticos o complementos alimenticios. La preparación tiene lugar según procedimientos habituales en la técnica.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de un extracto de acuerdo con la invención o de un preparado de extracto de acuerdo con la invención para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades inflamatorias de los vasos sanguíneos o del tracto gastrointestinal, en el caso de un trastorno venoso de la microcirculación, en el caso de enfermedades condicionadas por isquemia, en el caso de dolores hemorroidales o en el caso de trombosis perianal. En el caso de la enfermedad inflamatoria de los vasos sanguíneos tratada de acuerdo con la invención se trata, en particular, de flebitis. En el caso del trastorno venoso de microcirculación tratado de acuerdo con la invención se trata, en particular, de una insuficiencia crónica-venosa (CVI). En el caso de enfermedades condicionadas por isquemia tratadas de acuerdo con la invención se trata, en particular, de enfermedades del corazón, en especial de infarto de corazón.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de un extracto de acuerdo con la invención o de un preparado de extracto de acuerdo con la invención para el tratamiento o la profilaxis de inflamaciones agudas o crónicas del tracto gastrointestinal o dolores hemorroidales o trombosis perianal.

Los usos de acuerdo con la invención para el tratamiento pueden tener lugar tras la administración intravasal, peroral, rectal o transdermal del extracto de acuerdo con la invención o del preparado de extracto de acuerdo con la invención. En este caso, los extractos de acuerdo con la invención o los preparados de extracto de acuerdo con la invención presentan un efecto tópico o sistémico.

La invención se explica con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Métodos de medición utilizados

Parámetros químicos

La determinación del contenido de los flavonoides tiene lugar mediante un método HPLC que abarca los flavonoides isoquercitrina, quercetin-3-O-β-D-glucurónido y canferol-3-O-β-D-glucósido. Como fase estacionaria sirve en este caso una columna de separación Superspher RP8 con partículas de 4 µm, con una dimensión de 125 x 4 mm. La separación isocrática tiene lugar a un caudal de 1 ml/min en un horno de columna a 25ºC. El eluyente se compone de 107 partes de tetrahidrofurano, 55 partes de acetonitrilo y 810 partes de ácido fosfórico (0,003 mol/l). La detección tiene lugar a 360 nm.
El contenido de antocianos se determina con un método de HPLC separado análogamente a la Farmacopea Europea 6.4 Monografía 2394 “Fresh Bilberry fruit dry extract, refined and standardised”.

Modelo in vitro farmacológico para la inhibición de citoquinas

Monocitos humanos se estimulan a 37ºC y 5% de CO_2 durante 24 h con LPS (10 ng/ml). Los extractos se añaden durante 30 minutos antes de la adición del LPS, con el fin de verificar si éstos pueden influir en la estimulación de LPS. Se sometieron a ensayo concentraciones medidas de los extractos entre 10 - 300 µg/ml. Al cabo de 24 horas se retiraron las soluciones sobrenadantes, se centrifugaron y se midieron las concentraciones en PGE-2, IL-6, IL-1 y TNF-alfa mediante ELISAs/EIAs (Biotrend / Immunotools) conforme a las prescripciones del fabricante.

Ejemplo 1: Extracto de referencia acuoso (estado de la técnica)

2 kg de fármaco Folia Vitis vinífera Farmacopea Europea se extraen con 24 litros de agua de ósmosis a 75ºC en el percolador. El material eluido se filtra y se concentra a depresión para formar un extracto espeso con aprox. 50% de proporción de sustancia seca. El material espeso se mezcla con 4% de dióxido de silicio y se seca a 50ºC en el armario de secado en vacío. El extracto obtenido se caracteriza por un DEVnativo de 5 : 1, un contenido en flavonoides de 5,1% y un contenido de antocianos de 0,15%.

[%] Inhibición de la descarga de			
TNF-alfa	IL-1ß	IL-6	PGE-2
50,4 ± 5,9 a 50 µg/ml	46,9 ± 1,9 a 300 µg/ml	42,5 ± 5,3 a 50 µg/ml	11,6 ± 5,5 a 300 µg/ml

Ejemplo 2: extracto adsorbente de acuerdo con la invención (base acuosa)

2 kg de fármaco Folia Vitis vinífera Farmacopea Europea se extraen con 44 litros de agua de ósmosis a 75ºC en el percolador. El material eluido se concentra a depresión para formar un extracto espeso con aprox. 50% de proporción de sustancia seca. El material espeso se almacena en frío a lo largo de 16 horas y se vuelve a diluir con agua de ósmosis a una proporción de sustancia seca de 10%. Después de 24 horas, los curtientes (taninos) precipitados se separan por filtración y a continuación el extracto diluido se aplica sobre material adsorbente XAD7HP. El adsorbente cargado se lava con agua de ósmosis y, a continuación, los componentes del extracto se eluyen con etanol. La fase en etanol se concentra por evaporación hasta una proporción de sustancia seca de > 50%. El material espeso obtenido se seca de forma natural a 50ºC en el armario de secado en vacío. El extracto obtenido se caracteriza por un DEVnativo de 19 : 1, un contenido en flavonoides de 21,1% y un contenido de antocianos de 0,77%.

[%] Inhibición de la descarga de		
Citoquina	IL-6	PGE-2
Extracto conforme al Ej. 2	42,5 ± 4,6 a 10 µg/ml	32,1 ± 7,1 a 50 µg/ml
Extracto conforme al Ej. 1	42,5 ± 5,3 a 50 µg/ml	11,6 ± 5,5 a 300 µg/ml

Para el extracto de adsorbente según el Ejemplo 2 se pudo detectar un aumento de la inhibición de citoquinas con respecto al estado de la técnica según el Ej. 1.

En el caso de IL-6 es necesaria una concentración de extracto menor en un factor de 5 del extracto de acuerdo con la invención con el fin de alcanzar el mismo efecto antiinflamatorio.

La influencia de PGE-2 está acusada todavía con mayor intensidad. En el caso de una concentración de medida de 300 µg/ml según el Ej. 1 se pudo medir sólo una inhibición de 11,6%. El extracto de acuerdo con la invención según el Ej. 2 alcanzó con una concentración 6 veces más baja de 50 µg/ml incluso una inhibición de 32,1%.

Estas dos concentraciones en torno al factor 5 o bien al factor 18 (valor en % 3 veces mejor x factor de concentración 6) se encuentran por encima del factor de enriquecimiento de 3,8 del extracto de acuerdo con la invención frente al Ej. 1. El factor de enriquecimiento de 3,8 resulta del cociente del DEV nativo con los extractos a comparar.

Ejemplo 3: Extracto de acuerdo con la invención (mediante extracción líquido-líquido)

2 kg de fármaco Folia Vitis vinífera Farmacopea Europea se extraen con 44 litros de agua de ósmosis a 75ºC en el percolador. El material eluido se concentra a depresión para formar un extracto espeso con aprox. 50% de proporción de sustancia seca. El material espeso se almacena en frío a lo largo de 16 horas y se vuelve a diluir con agua de ósmosis a una proporción de sustancia seca de 10%. Después de 24 horas, la fracción de taninos se separa por filtración y a continuación el extracto diluido se somete dos veces con n-butanol en la relación 3:2. La fase en butanol se concentra por evaporación hasta una proporción de sustancia seca de > 50%. El material espeso obtenido se seca de forma natural a 50ºC en el armario de secado en vacío. El extracto obtenido se caracteriza por un DEVnativo de 16 : 1, un contenido en flavonoides de 21,7% y un contenido de antocianos de 0,43%. La fase acuosa remanente se caracteriza por un DEVnativo de 5 : 1, un contenido en flavonoides de < 0,1% y un contenido de antocianos por debajo del límite de detección.

	[%] Inhibición de la descarga de		
	TNF-alfa	IL-1ß	PGE 2
Fase de BuOH Ej. 3A	52,2 ± 6,7 a 10 µg/ml	55,8 ± 6,6 a 10 µg/ml	24,3 ± 3,9 a 50 µg/ml
Fase de H_2O Ej. 3B	17,1 ± 4,8 a 50 µg/ml	39,8 ± 6,0 a 300 µg/ml	1,6 ± 4,6 a 300 µg/ml

La comparación de ambas fases a partir del tratamiento líquido-líquido demuestra claramente que los principios antiinflamatorios se pueden enriquecer en la fase orgánica (butanol).

Para el extracto enriquecido en butanol según el Ejemplo 3A se pudo determinar un aumento de la inhibición de citoquinas de factor 15 (TNF-a), factor 42 (IL-1β) y factor 91 (PGE-2) con respecto a la fase acuosa separada según el Ej. 3B. Frente a ello, se encuentra sólo un factor de enriquecimiento de 3,2 (con cociente del DEV nativo con respecto a los extractos comparativos Ej. 3A frente a Ej. 3B).
Esto subraya el enriquecimiento selectivo de los principios activos a base de la fase acuosa en la fase orgánica.

También el extracto de acuerdo con la invención según el Ej. 3A es superior al estado de la técnica.

[%] Inhibición de la descarga de		
Citoquina	TNF-alfa	PGE 2
Extracto conforme a Ej. 3A	52,2 ± 6,7 a 10 µg/ml	24,3 ± 3,9 a 50 µg/ml
Extracto conforme a Ej. 1	50,4 ± 5,9 a 50 µg/ml	11,6 ± 5,5 a 300 µg/ml

Para el extracto según el Ejemplo 3A pudo detectarse un aumento de la inhibición de citoquina con respecto al estado de la técnica según el Ej. 1.

En el caso de TNF-alfa es necesaria una concentración de extracto menor en un factor de 5 del extracto 3A de acuerdo con la invención con el fin de alcanzar el mismo efecto antiinflamatorio.

La influencia de PGE-2 está todavía más intensamente acusada. En el caso de una concentración medida de 300 µg/ml según el Ej. 1 pudo medirse sólo una inhibición de 11,6%. El extracto de acuerdo con la invención según el Ej. 2 alcanzó con una concentración 6 veces menor de 50 µg/ml incluso una inhibición de 24,3%.

Estas dos concentraciones en torno al factor 5 o bien al factor 12 (valor en % 2 veces mejor x factor de concentración 6) se encuentran por encima del factor de enriquecimiento de 3,2 del extracto de acuerdo con la invención frente al Ej. 1. El factor de enriquecimiento de 3,2 resulta del cociente del DEV nativo con los extractos a comparar.

Ejemplo 4: Preparación de un extracto etanólico de acuerdo con la invención

2 kg de fármaco Folia Vitis vinífera Farmacopea Europea se extraen con 24 litros de EtOH al 40% v/v a 45ºC en el percolador. El material eluido se concentra a depresión para formar un extracto espeso con aprox. 50% de proporción de sustancia seca. El material espeso se almacena en frío a lo largo de 16 horas y se vuelve a diluir con agua de ósmosis a una proporción de sustancia seca de 10%. Después de 24 horas, los taninos precipitados se separan por filtración y a continuación el extracto diluido se libera de demás sustancias de alto peso molecular co-extraídas mediante una filtración en membrana (PMCO 300 kDa). La fracción resultante (material permeado) se lleva a sequedad en vacío a 50ºC. El extracto obtenido se caracteriza por un DEVnativo de 6,7 : 1 y un contenido en flavonoides de 7,6%.

Ejemplo 5: Preparación de un extracto de adsorbente de acuerdo con la invención (base EtOH)

2 kg de fármaco Folia Vitis vinífera Farmacopea Europea se extraen con 24 litros de EtOH al 20% v/v a 75ºC en el percolador. El material eluido se concentra a depresión para formar un extracto espeso con aprox. 50% de proporción de sustancia seca. El material espeso se almacena en frío a lo largo de 16 horas y se vuelve a diluir con agua de ósmosis a una proporción de sustancia seca de 10%. Después de 24 horas, los taninos precipitados se separan por filtración y a continuación el extracto diluido se aplica sobre material adsorbente XAD7HP. El adsorbente cargado se lava con agua de ósmosis y a continuación los componentes del extracto se eluye con etanol. La fase en etanol se concentra por evaporación a una proporción de sustancia seca de > 50%. El material espeso obtenido se seca de forma nativa a 50ºC en el armario de secado en vacío. El extracto obtenido se caracteriza por un DEVnativo de 21 : 1 y un contenido en flavonoides de 25,1%.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un extracto a partir de hojas de *Vitis vinífera L.*, que comprende las siguientes etapas:
   a) proporcionar un fármaco a base de hojas de *Vitis vinífera L.*
   b) extracción del fármaco con un eluyente elegido de agua y mezclas de agua con alcohol, obteniéndose un extracto bruto,
   c) separación del extracto bruto del fármaco extraído,
   d) separación al menos parcial del eluyente, obteniéndose un extracto espeso,
   e) retro-disolución del extracto espeso en agua,
   f) separación de componentes insolubles,
   g) enriquecimiento selectivo de sustancias constitutivas secundarias de la planta mediante
      i. una extracción de 2 fases o
      ii. ultrafiltración en membrana.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el eluyente contiene agua o una mezcla de etanol y agua que contiene 5 - 95% (v/v) de etanol.

3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el eluyente para la extracción se calienta a una temperatura de 40 - 80ºC, preferiblemente a 15 - 25ºC por debajo de la temperatura de ebullición.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la extracción de 2 fases es una extracción de fases sólidas.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la segunda fase es una resina adsorbente, preferiblemente elegida del grupo de los copolímeros de divinilbenceno hidrofóbicos no iónicos, polímeros de ésteres alifáticos y polímeros de formofenol.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la extracción de 2 fases es una extracción líquido-líquido.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la segunda fase es un líquido no miscible con agua, elegido del grupo de los alcoholes, cetonas, alcanos o ésteres.

8. Extracto, obtenible mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Extracto según la reivindicación 8, en donde la relación de fármaco nativo a extracto (DEVnativo) asciende a 12 : 1 hasta 40 : 1, el contenido total en flavonoides asciende a al menos 15% en peso y el contenido en antocianos asciende a al menos 0,1% en peso.

10. Preparado de extracto que contiene un extracto de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 9, así como al menos un coadyuvante fisiológicamente compatible.

11. Uso de un extracto o de un preparado de extracto según una de las reivindicaciones 8 a 10, para la preparación de medicamentos, preparados farmacéuticos o complementos alimenticios.

12. Extracto o preparado de extracto según una de las reivindicaciones 8 a 10, para el uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades inflamatorias de los vasos sanguíneos o del tracto gastrointestinal, en el caso de un trastorno venoso de la microcirculación, en el caso de enfermedades condicionadas por isquemia, en el caso de dolores hemorroidales o en el caso de trombosis perianal.

13. Extracto o preparado de extracto según la reivindicación 12, en donde la enfermedad inflamatoria de los vasos sanguíneos es una flebitis.

14. Extracto o preparado de extracto según la reivindicación 12, en donde el trastorno venoso de la microcirculación es una insuficiencia crónica-venosa (CVI).

15. Extracto o preparado de extracto según la reivindicación 12, en donde las enfermedades condicionadas por isquemia se eligen de enfermedades del corazón, en especial de infarto de corazón.