

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 831 603**

51 Int. Cl.:

A23L 33/105 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61K 36/61 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 31/357 (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2013 PCT/IB2013/054727**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13186680**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2013 E 13804810 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2020 EP 2858657**

54 Título: **Extracto de fruto de feijoa**

30 Prioridad:

11.06.2012 NZ 60056012
11.06.2012 NZ 60056112

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.06.2021

73 Titular/es:

CALLAGHAN INNOVATION (50.0%)
Gracefield Research Centre, 69 Gracefield Road,
Gracefield
Lower Hutt, 5010 , NZ y
SOUTHWEST SCIENTIFIC EDITING &
CONSULTING L.L.C. (50.0%)

72 Inventor/es:

FOO, LAI YEAP y
WATSON, RONALD ROSS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 831 603 T3

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

DESCRIPCIÓN

Extracto de fruto de feijoa

1. Campo técnico

5 La invención se refiere a un extracto de fruto de feijoa. En particular, la invención se refiere a usos terapéuticos de un extracto de fruto de feijoa, un proceso para preparar el extracto y composiciones que comprenden el extracto.

2. Antecedentes

10 La diabetes mellitus y la obesidad se han convertido en importantes problemas de salud mundial. Aproximadamente el 7% de la población estadounidense está afectada por la diabetes y se estima que 600 millones de personas eran obesas en 2010. Se espera que el número de personas afectadas por estas afecciones aumente sustancialmente en los próximos 25 años.

La diabetes de tipo 2 es la forma más común de diabetes y representa el 90% de todos los casos. La diabetes tipo 2 aumenta el riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular, debido a los efectos vasculares perjudiciales de la exposición prolongada a un entorno hiperglucémico, así como a la mayor prevalencia de factores de riesgo cardiovascular asociados: aterosclerosis, hipertensión y anomalías de la coagulación.

15 Los enfermos a menudo tienen sobrepeso y sufren de hipertensión (presión arterial alta) e hiperlipidemia (niveles elevados o anormales de lípidos en sangre). Estas afecciones tienen un gran impacto en el bienestar y el estilo de vida de quienes las padecen. La hiperglucemia sostenida durante un período prolongado de tiempo puede causar daño severo a los ojos, riñones, nervios y suponer un mayor riesgo de complicaciones adicionales como ataque cardíaco, accidente cerebrovascular, amputación de miembros inferiores y muerte. Los riesgos de hiperlipidemia por diabetes pueden incluir pancreatitis, formación de placa, endurecimiento de las arterias y un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular.

La obesidad es un factor clave para la diabetes de tipo 2. En la actualidad, los tratamientos actuales para la obesidad, excepto la extirpación quirúrgica del tejido, no han logrado dar como resultado una reducción sostenida de la obesidad. Además, los fármacos utilizados para tratar la obesidad pueden tener efectos secundarios graves.

25 El tratamiento implica inicialmente cambios en el estilo de vida, la dieta o la administración de medicamentos orales. A menudo, los pacientes reciben un tratamiento no específico, lo que da lugar a efectos secundarios indeseables como diarrea y náuseas. La búsqueda de nuevos tratamientos continúa. Los productos y extractos naturales ocupan un lugar especial en el mercado, ya que se cree que dichos tratamientos son menos tóxicos y más aceptables para la población en general que las terapias farmacéuticas.

30 La artritis reumatoide también se ha convertido en un importante problema de salud mundial. Aproximadamente el 1% de la población estadounidense se ve afectada por la artritis reumatoide. Se espera que el número de personas afectadas por esta afección aumente sustancialmente durante los próximos 25 años.

35 La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por la inflamación crónica y la destrucción de las articulaciones y el tejido circundante. Está asociada con un aumento de la mortalidad. El origen exacto del inicio de la artritis reumatoide sigue siendo desconocido. Sin embargo, la artritis reumatoide implica un desequilibrio sistémico entre las actividades de las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, lo que provoca la inducción de inflamación crónica y daño articular. Por lo tanto, la mayoría de los agentes terapéuticos para la AR se han diseñado para modular los niveles de citoquinas; por ejemplo, los antagonistas del receptor del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y de la interleucina 1 (IL-1) han mostrado una actividad prometedora en la prevención de la destrucción articular por la AR. Sin embargo, las inmunosupresiones humores por antagonistas presentan efectos terapéuticos sólo durante un período limitado. El tratamiento para la artritis reumatoide a menudo es a largo plazo e incluye tanto medicamentos como fisioterapia.

40 Algunas investigaciones sugieren una conexión entre la artritis reumatoide y la diabetes de tipo 2. Las personas con artritis reumatoide muestran un mayor riesgo de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Wasko M.C.; Kay, J.; Hsia, H.C. and Rahman, M.U. Arthritis Care Res (Hoboken) 2011, 63(4): 512-21).

45 El vínculo puede deberse a la inflamación que se produce con la artritis reumatoide, que puede provocar resistencia a la insulina. Algunos medicamentos que se usan para tratar la artritis reumatoide también pueden aumentar el riesgo de diabetes tipo 2. Los esteroides como la prednisona pueden inducir diabetes tipo 2 en quienes ya están en riesgo de padecerla. Los síntomas de la artritis reumatoide también pueden contribuir. El dolor articular y la fatiga general desalientan el ejercicio físico, lo que dificulta que los sujetos mantengan la aptitud cardiovascular y controlen el aumento de peso.

Por lo tanto, existe la necesidad de terapias alternativas que puedan ayudar a prevenir y controlar estas afecciones. Es un objeto de la invención proporcionar un extracto de fruto natural que sirva al menos de alguna manera para satisfacer esta necesidad, o al menos proporcione al público una opción útil.

3. Resumen de la invención

La invención proporciona generalmente usos del extracto de fruto de feijoa en aplicaciones medicinales asociadas con el tratamiento de la diabetes tipo 2 y afecciones relacionadas, y el tratamiento de la artritis reumatoide y afecciones relacionadas. El extracto de feijoa de la invención se puede usar para tratar ambas afecciones simultáneamente, o se puede usar para aliviar los síntomas en un sujeto con artritis reumatoide, a la vez que se reduce simultáneamente el riesgo de que el sujeto desarrolle diabetes tipo 2.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para reducir los lípidos séricos en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para reducir la glucosa sérica en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para reducir la presión arterial en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno en un paciente humano con diabetes tipo 2 donde es deseable reducir la presión arterial, que comprende administrar al paciente humano una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. La enfermedad o trastorno puede ser hipertensión o cualquier enfermedad o trastorno asociado con presión arterial elevada.

En un quinto aspecto, la invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno en un paciente humano con diabetes tipo 2 en donde es deseable reducir los lípidos en sangre, por ejemplo, el colesterol y los triglicéridos, que comprende administrar al paciente humano una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. La enfermedad o trastorno puede ser hiperlipidemia o cualquier otra enfermedad o trastorno asociado con lípidos sanguíneos elevados.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno en el paciente humano con diabetes tipo 2 donde es deseable reducir la glucosa en sangre, que comprende administrar a un paciente humano una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. La enfermedad o trastorno puede ser hiperglucemia o cualquier otra enfermedad o trastorno asociado con niveles elevados de glucosa en sangre. La invención proporciona además un método para reducir el nivel de HbA1c en el paciente, que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de extracto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un método para mejorar los síntomas de diabetes asociados con hiperglucemia, hiperlipidemia y/o hipertensión en un paciente humano con diabetes tipo 2, que comprende administrar al paciente humano una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa.

En un octavo aspecto, la invención proporciona un método para mejorar los síntomas del síndrome metabólico asociado con hiperglucemia, hiperlipidemia y/o hipertensión en un paciente humano, que comprende administrar al paciente humano una cantidad efectiva de extracto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

En un noveno aspecto, la invención proporciona un método para prevenir o reducir la obesidad en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano.

En un décimo aspecto, la invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno asociado con la obesidad.

En un undécimo aspecto, la invención proporciona un método para reducir los niveles de colesterol total hepático en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano obeso.

En un duodécimo aspecto, la invención proporciona un método para mejorar los síntomas de hiperglucemia, hiperlipidemia y/o hipertensión asociados con la obesidad en un paciente humano, que comprende administrar al paciente humano una cantidad efectiva de extracto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

En los aspectos anteriores, en una realización, el paciente puede padecer artritis reumatoide.

En un decimotercer aspecto, la invención proporciona un método para regular la función inmunitaria en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa.

- En un decimocuarto aspecto, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la inmunosenescencia en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa.
- 5 En un decimoquinto aspecto, la invención proporciona un método para prevenir o tratar los síntomas de la artritis reumatoide, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa.
- En un decimosexto aspecto, la invención proporciona un método para reducir los niveles de citoquinas inflamatorias asociadas con la artritis reumatoide, que comprende administrar una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa a un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con artritis reumatoide.
- 10 En un decimoséptimo aspecto, la invención proporciona un método para reducir la hiperplasia sinovial asociada con la artritis reumatoide, que comprende administrar una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa a un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con artritis reumatoide.
- En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para reducir los lípidos séricos en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.
- 15 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para reducir la glucosa sérica en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.
- En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para reducir la presión arterial en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.
- 20 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno en donde es deseable reducir la presión arterial. La enfermedad o trastorno puede ser hipertensión o cualquier enfermedad o trastorno asociado con presión arterial elevada. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.
- En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno en donde es deseable reducir los lípidos en sangre, por ejemplo, colesterol y triglicéridos. La enfermedad o trastorno puede ser hiperlipidemia o cualquier otra enfermedad o trastorno asociado con lípidos sanguíneos elevados. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.
- 25 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno en donde es deseable reducir la glucosa en sangre. La enfermedad o trastorno puede ser hiperglucemia o cualquier otra enfermedad o trastorno asociado con niveles elevados de glucosa en sangre. La invención proporciona además el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para reducir el nivel de HbA1c en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.
- 30 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para mejorar los síntomas de diabetes asociados con hiperglucemia, hiperlipidemia y/o hipertensión en un paciente humano.
- 35 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para mejorar los síntomas del síndrome metabólico asociado con hiperglucemia, hiperlipidemia y/o hipertensión en un paciente humano. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.
- En otro aspecto de la invención el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para prevenir o reducir la obesidad en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano.
- 40 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno asociado con la obesidad.
- En todavía otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para reducir los niveles de colesterol total hepático en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano obeso.
- 45 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para mejorar los síntomas de hiperglucemia, hiperlipidemia y/o hipertensión asociados con la obesidad en un paciente humano. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.
- En todavía otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la reducción de los lípidos séricos en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.
- 50 En todavía otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la reducción de la glucosa sérica en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la reducción de la presión arterial en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

5 En todavía otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno en donde es deseable reducir la presión arterial. La enfermedad o trastorno puede ser hipertensión o cualquier enfermedad o trastorno asociado con presión arterial elevada. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

10 En todavía otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno en donde es deseable reducir los lípidos en sangre, por ejemplo, colesterol y triglicéridos. La enfermedad o trastorno puede ser hiperlipidemia o cualquier otra enfermedad o trastorno asociado con lípidos sanguíneos elevados. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

15 En todavía otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno en donde es deseable reducir la glucosa en sangre. La enfermedad o trastorno puede ser hiperglucemia o cualquier otra enfermedad o trastorno asociado con niveles elevados de glucosa en sangre. La invención proporciona además extracto de fruto de feijoa para su uso en la reducción del nivel de HbA1c en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la mejora de los síntomas de diabetes asociados con hiperglucemia, hiperlipidemia y/o hipertensión en un paciente humano.

20 En todavía otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la mejora de los síntomas del síndrome metabólico asociado con hiperglucemia, hiperlipidemia y/o hipertensión en un paciente humano. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un extracto de fruto de feijoa para su uso en la prevención o el tratamiento de la obesidad.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un extracto de fruto de feijoa para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la obesidad.

25 En todavía otro aspecto, la invención proporciona un extracto de fruto de feijoa para su uso en la reducción de los niveles de colesterol total hepático en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano obeso.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la mejora de los síntomas de obesidad asociados con hiperglucemia, hiperlipidemia y/o hipertensión en un paciente humano. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

30 En todavía otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la regulación de la función inmunológica en un paciente.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la inmunosenescencia en un paciente.

35 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para regular la función inmunológica en un paciente.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar los síntomas de la artritis reumatoide.

40 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa para reducir los niveles de citoquinas inflamatorias asociadas con la artritis reumatoide, que comprende administrar una cantidad efectiva de extracto de feijoa a un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con artritis reumatoide.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa para reducir la hiperplasia sinovial asociada con la artritis reumatoide, que comprende administrar una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa a un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con artritis reumatoide.

45 En todavía otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la regulación de la función inmunológica en un paciente.

En otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la prevención o el tratamiento de la artritis reumatoide.

50 En otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la reducción de citoquinas inflamatorias asociadas con la artritis reumatoide, que comprende administrar una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa a un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con artritis reumatoide.

En otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la reducción de la hiperplasia sinovial asociada con la artritis reumatoide, que comprende administrar una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa a un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con artritis reumatoide.

5 En todavía otro aspecto, la invención proporciona una composición para reducir los lípidos séricos en un paciente, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición para reducir la glucosa sérica en un paciente, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

10 En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición para reducir la presión arterial en un paciente, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

15 En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno en donde es deseable reducir la presión arterial, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. La enfermedad o trastorno puede ser hipertensión o cualquier enfermedad o trastorno asociado con presión arterial elevada. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

20 En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno en donde es deseable reducir los lípidos en sangre, por ejemplo, el colesterol y los triglicéridos, que comprende una cantidad efectiva de extracto de feijoa. La enfermedad o trastorno puede ser hiperlipidemia o cualquier otra enfermedad o trastorno asociado con lípidos sanguíneos elevados. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

25 En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno en donde es deseable reducir la glucosa en sangre, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. La enfermedad o trastorno puede ser hiperglucemia o cualquier otra enfermedad o trastorno asociado con niveles elevados de glucosa en sangre. La invención proporciona además una composición para reducir el nivel de HbA1c en un paciente. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición para mejorar los síntomas de diabetes asociados con hiperglucemia, hiperlipidemia y/o hipertensión en un paciente humano, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa.

30 En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición para mejorar los síntomas del síndrome metabólico asociado con hiperglucemia, hiperlipidemia y/o hipertensión en un paciente humano, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.

35 En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición para mejorar los síntomas de hiperglucemia, hiperlipidemia y/o hipertensión asociados con la obesidad en un paciente humano, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con diabetes tipo 2.v

En otro aspecto, la invención proporciona una composición para prevenir o tratar la obesidad, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno asociado con la obesidad, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa.

40 En otro aspecto, la invención proporciona una composición para reducir el colesterol total hepático en un paciente, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano obeso.

En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición para regular la función inmunológica en un paciente, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa.

45 En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno asociado con la inmunosenescencia en un paciente, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. En otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la fabricación de un medicamento.

En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición para regular la función inmunológica en un paciente, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa.

50 En otro aspecto, la invención proporciona una composición para prevenir o tratar la artritis reumatoide, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición para reducir los niveles de citoquinas inflamatorias asociadas con la artritis reumatoide, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con artritis reumatoide.

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona una composición para reducir la hiperplasia sinovial asociada con la artritis reumatoide, que comprende una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. El paciente puede ser un paciente humano con artritis reumatoide.

En otro aspecto, la invención proporciona extracto de fruto de feijoa para su uso en la fabricación de un medicamento.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa como medicamento.

- 10 En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende extracto de fruto de feijoa. La composición puede ser un alimento o un producto alimenticio. Alternativamente, la composición puede ser un suplemento dietético, como un nutraceutico u otra composición nutricional.

En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende extracto de fruto de feijoa, mezclado con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 15 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de extracto de fruto de feijoa como nutraceutico, tal como un suplemento dietético, o como ingrediente activo en la preparación de alimentos y bebidas medicos o funcionales.

Preferiblemente, el extracto de fruto de feijoa usado en cualquiera de los métodos, usos y composiciones descritos anteriormente se proporciona en forma de una composición farmacéutica, un nutraceutico, por ejemplo, un suplemento dietético o un producto alimenticio, por ejemplo, un alimento o bebida médica o funcional.

- 20 En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consta de: catequina, epicatequina, galocatequina, proantocianidinas, ácido elágico, pedunculagina, luteolina y elagitaninos relacionados. Más preferiblemente, el extracto de fruto de feijoa comprende dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en: catequina, epicatequina, galocatequina, proantocianidinas, ácido elágico, pedunculagina, luteolina y elagitaninos relacionados.

- 25 En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consta de: catequina, epicatequina, galocatequina, proantocianidinas, flavonas, flavonoides, ácido elágico, pedunculagina y elagitaninos relacionados. Más preferiblemente, el extracto de fruto de feijoa comprende dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en: catequina, epicatequina, galocatequina, proantocianidinas, flavonas, flavanoles, ácido elágico, pedunculagina y elagitaninos relacionados.

- 30 En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende (a) al menos una proantocianidina oligomérica (b) al menos un elagitanino y (c) flavona.

En otra realización, el extracto de fruto de feijoa comprende (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso de proantocianidina oligomérica y (b) aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos.

En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende pedunculagina.

- 35 En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende al menos aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% en peso de compuestos polifenólicos.

En una realización, el extracto de fruto de feijoa se prepara mediante un proceso que incluye los pasos (i) a (vi) definidos a continuación.

En otro aspecto, la invención proporciona un proceso para preparar extracto de fruto de feijoa, que incluye los pasos de:

- 40 i) poner en contacto el fruto entero de feijoa y/o la piel del fruto de feijoa y/o la pulpa del fruto de feijoa y/o los residuos del fruto de feijoa del zumo del fruto de feijoa, con un disolvente orgánico, agua o un disolvente acuoso/orgánico para proporcionar o extracto acuoso/orgánico y un residuo sólido; y

ii) separar el extracto acuoso, orgánico u acuoso/orgánico del residuo sólido para dar un extracto de feijoa crudo acuoso, orgánico u acuoso/orgánico.

- 45 iii) evaporar el extracto de feijoa acuoso, orgánico u acuoso/orgánico crudo del paso (ii) para dar un concentrado de extracto de feijoa sustancialmente acuoso y un precipitado; y

iv) separar del precipitado el concentrado de extracto de fruto de feijoa sustancialmente acuoso.

v) poner en contacto el extracto de feijoa sustancialmente acuoso del paso (iv) con una resina polimérica para adsorber al menos un componente del extracto de feijoa sustancialmente acuoso;

vi) eluir al menos un componente de la resina con un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos para obtener el extracto de feijoa.

4. Breve descripción de las figuras

5 La Figura 1 muestra trazas de HPLC de extracto de feijoa preparado en el Ejemplo 1 y analizado en el Ejemplo 2. El cromatograma superior es del detector de arreglo de diodos, el cromatograma inferior es la corriente iónica total (electroaspersión, modo positivo) del espectrómetro de masas.

La Figura 2 muestra las imágenes radiológicas de las patas de ratones (A) control normal, (B) control artrítico, (C) tratados con metotrexato y (D) suplementados con extracto de fruto de feijoa en el estudio de ratones con artritis inducida por colágeno (Ejemplo 6)

10 La Figura 3 muestra imágenes histológicas después de la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de las secciones articulares de las patas de ratones (A) control normal, (B) control artrítico, (C) suplementados con extracto de fruto de feijoa y (D) tratados con metotrexato el estudio de ratón con artritis inducida por colágeno (Ejemplo 6).

5. Descripción detallada de la invención

5.1 Abreviaturas

15	ACE	Enzima convertidora de angiotensina
	BP	Presión arterial
	CM	Medios de cultivo
	ConA	Concanavalina A
	ECV	Enfermedad cardiovascular
20	ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
	FBS	Suero bovino fetal
	FITC	Isotiocianato de fluoresceína
	HbAlc	Hemoglobina glicosilada Alc
	HCl	Ácido clorhídrico
25	HDL	Lipoproteína de alta densidad
	IL	interleucina
	IFN	Interferón I
	IgG1	Inmunoglobulina G1
	IkB α	Factor nuclear del potenciador del gen del polipéptido ligero kappa en inhibidor de células B, alfa
30	Kg	kilogramos
	LDL	Lipoproteína de baja densidad
	LPS	Lipopolisacárido
	MDA	Malondialdehído
	MAb	Anticuerpo monoclonal
35	MI	Índice de mitogénesis
	nM	Nanomolar
	SIN	Óxido Nítrico
	PBS	Solución salina regulada con fosfato
	PPE	Ficoeritrina
40	PGE	prostaglandina E2
	PHA	Fitohemaglutinina
	RPMI 1640	Un medio líquido comercial

5.2 Definiciones

45 El término "extracto de fruto de feijoa" como se usa en este documento significa un extracto del fruto de feijoa, incluyendo el fruto entero y/o piel del fruto de feijoa y/o pulpa de fruto de feijoa y/o residuos de fruto de feijoa que quedan después de exprimir el fruto (orujo de feijoa). El fruto o partes del mismo pueden estar frescas, congeladas (y luego descongeladas) o secas. El zumo que se recupera de cualquier procesamiento del fruto también se procesará para recuperar un extracto de fruto de feijoa.

El término "piel de fruto de feijoa", como se usa en este documento, significa la cubierta cerosa exterior del fruto.

50 El término "pulpa de fruto de feijoa", como se usa aquí, significa el contenido carnoso del fruto de feijoa.

El término "orujo de fruto de feijoa" como se usa en este documento se refiere al residuo de fruto obtenido después de exprimir el fruto.

El término "paciente" incluye animales humanos y no humanos.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares incluyen la reducción o alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, para hiperglucemia, hiperlipidemia o hipertensión, esto puede significar una reducción de los niveles de glucosa en suero, niveles de lípidos en suero o presión sanguínea, respectivamente.

5 Los términos "prevenir", "prevención" y similares incluyen la prevención de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno.

El término "que comprende" como se usa en esta especificación y reivindicaciones significa "que consiste al menos en parte de". Cuando se interpretan declaraciones en esta especificación y reivindicaciones que incluyen el término "que comprende", también pueden estar presentes otras características además de las características precedidas por este término en cada afirmación. Los términos relacionados tales como "comprende" y "comprendido" deben interpretarse de manera similar.

6. Descripción detallada

La investigación sobre la nutrición humana ha llevado a conocer los beneficios para la salud de los suplementos dietéticos. Se reconoce que los suplementos dietéticos que contienen matrices complejas de compuestos bioactivos naturales pueden conferir importantes beneficios para la salud a largo plazo.

15 La *Feijoa sellowiana* Berg syn. *Acca sellowiana*, comúnmente conocida como piña-guayaba, es un arbusto de hoja perenne que da frutos, pariente de la guayaba tropical. La planta de feijoa es autóctona de América del Sur, pero se puede encontrar en áreas secas tropicales y subtropicales, particularmente en Nueva Zelanda. Se cultiva por su fruto, principalmente para la producción de zumo de sabor dulce y ácido.

20 La especie ha adquirido cierta relevancia medicinal debido a su contenido de compuestos de interés biológico y nutricional. Una revisión reciente ha demostrado que no se conocen informes de los efectos del consumo de feijoa en la salud, la prevención o la terapia de enfermedades, incluida la diabetes en humanos o animales. (Argüelles, M.C., Watson, R.R., Feijoa (pineapple-guava) fruit: A role in health promotion? In: R.R. Watson, V. Preedy, editors, Bioactive Foods and Extracts: Cancer Treatment and Prevention, CRC Press, publicado en diciembre de 2010, ISBN 1439816190)). Sin embargo, algunos estudios han demostrado una alta correlación entre el contenido total de fenol y la actividad captadora de radicales de extractos de feijoa en células cultivadas (Yuka, I., Yumiko, K., Miyo, N., Takashi K., J. Home. Econ. Japón, 2003, 54, 945-949). Por lo tanto, la fruto de feijoa se ha unido a una lista creciente de plantas comestibles que están siendo investigadas por sus propiedades medicinales.

Los solicitantes han descubierto que el extracto de fruto de feijoa tiene eficacia en el tratamiento y prevención tanto de la diabetes como de la artritis reumatoide.

30 6.1 El extracto de fruto de feijoa

El extracto de fruto de feijoa de la invención se prepara extrayendo el fruto de feijoa, incluido el fruto entero, y/o la piel del fruto de feijoa y/o la pulpa del fruto de feijoa y/o los residuos de fruto de feijoa que quedan después de exprimir el fruto.

35 El proceso de extracción se puede preparar usando técnicas de extracción estándar conocidas en la técnica. En una realización, el extracto de fruto de feijoa se prepara mediante un proceso que incluye los pasos (i) a (vi) definidos a continuación.

En un aspecto, la invención proporciona un proceso para preparar extracto de fruto de feijoa, que incluye los pasos de:

40 i) poner en contacto la fruto de feijoa, y/o la piel del fruto de feijoa, y/o la pulpa del fruto de feijoa y/o los residuos del fruto de feijoa del zumo del fruto de feijoa, con un disolvente orgánico hidrófilo, agua o un disolvente acuoso/orgánico para proporcionar un o extracto orgánico acuoso/hidrófilo y un residuo sólido; y

ii) separar el extracto acuoso, orgánico u acuoso/orgánico del residuo sólido para dar un extracto de feijoa crudo acuoso, orgánico u acuoso/orgánico;

45 iii) evaporar el extracto de feijoa acuoso, orgánico u acuoso/orgánico crudo del paso (ii) para dar un concentrado de extracto de feijoa sustancialmente acuoso y un precipitado;

iv) separar el concentrado de extracto de fruto de feijoa sustancialmente acuoso del precipitado; y

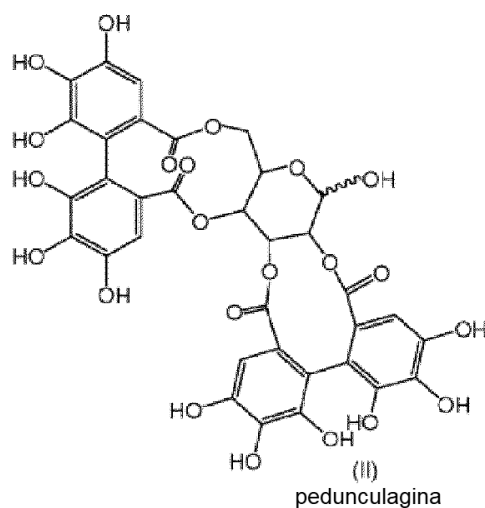
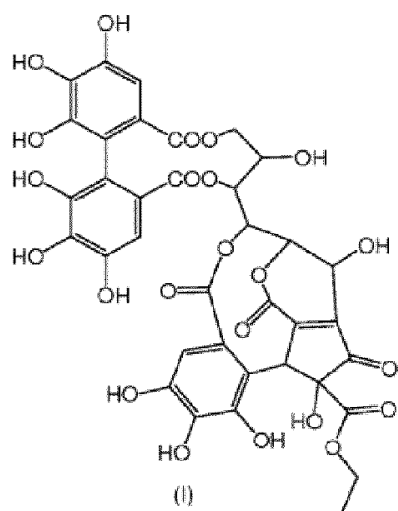
v) fraccionar el concentrado de extracto de fruto de feijoa sustancialmente acuoso del paso iv) para concentrar al menos un componente del mismo.

50 En una realización, el concentrado de extracto de fruto de feijoa sustancialmente acuoso del paso iv) se fracciona usando absorción de resina polimérica, separación cromatográfica, reparto de disolventes o precipitación selectiva.

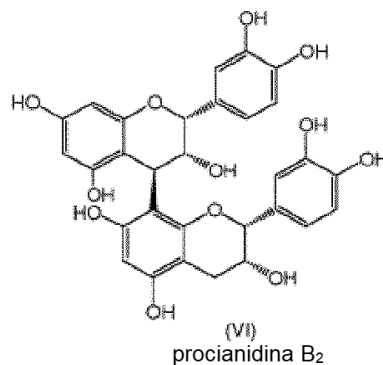
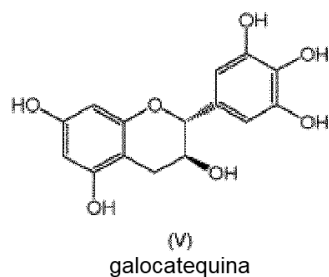
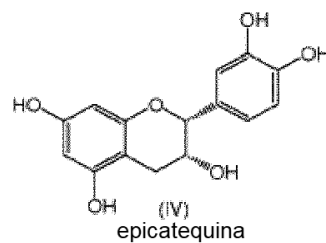
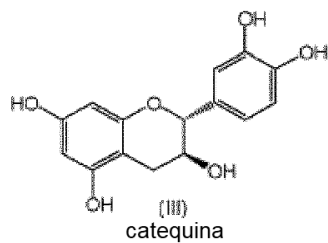
- En otra realización, el concentrado de extracto de fruto de feijoa sustancialmente acuoso del paso iv) puede secarse y disolverse en una mezcla de un disolvente orgánico y agua, por ejemplo, etanol:agua 70:30. Los azúcares y otros materiales polares no son solubles en este solvente. El secado de la mezcla de agua y disolvente orgánico proporcionará un extracto de feijoa más concentrado en compuestos polifenólicos. Este procedimiento se puede repetir varias veces.
- En otra realización, el concentrado de extracto de feijoa sustancialmente acuoso del paso iv) puede disolverse en un disolvente no miscible en agua, como acetato de etilo o 1-butanol para producir un extracto de feijoa no acuoso con altos niveles de polifenoles.
- En otro aspecto, la invención proporciona un proceso para preparar extracto de fruto de feijoa, que incluye los pasos de:
- i) poner en contacto el fruto entero de feijoa y/o la piel del fruto de feijoa y/o la pulpa del fruto de feijoa y/o los residuos del fruto de feijoa del zumo del fruto de feijoa, con un disolvente orgánico, agua o un disolvente acuoso/orgánico para proporcionar o extracto acuoso/orgánico y un residuo sólido; y
 - ii) separar el extracto acuoso, orgánico u acuoso/orgánico del residuo sólido para dar un extracto de feijoa crudo acuoso, orgánico u acuoso/orgánico;
 - iii) evaporar el extracto de feijoa acuoso, orgánico u acuoso/orgánico crudo del paso (ii) para dar un concentrado de extracto de feijoa sustancialmente acuoso y un precipitado;
 - iv) separar el concentrado de extracto de fruto de feijoa sustancialmente acuoso del precipitado;
 - v) poner en contacto el extracto de feijoa sustancialmente acuoso del paso (iv) con una resina polimérica para adsorber al menos un componente del extracto de feijoa sustancialmente acuoso;
 - vi) eluir al menos un componente de la resina con un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos para obtener el extracto de feijoa.
- El extracto de fruto de feijoa producido por el proceso de la invención se puede secar al vacío, secar por pulverización o secar por congelación para producir un polvo que fluye libremente.
- En una realización, el extracto de fruto de feijoa es un polvo que fluye libremente.
- El fruto entero de feijoa, y/o la piel del fruto de feijoa y/o la pulpa del fruto de feijoa y/o los residuos del fruto de feijoa que quedan después de exprimir el fruto pueden opcionalmente picarse, machacarse, triturarse, mezclarse, rebanarse o picarse antes del paso (i). El fruto o las porciones de fruto se pueden congelar y descongelar antes del paso (i). También se pueden secar antes del paso (i).
- La fruto de feijoa se puede exprimir (el zumo se extrae del fruto exprimiendo o por otros medios) antes del paso (i), proporcionando así dichos residuos de fruto de feijoa que quedan después de exprimir el fruto, que se puede utilizar en el paso (i). El zumo se puede llevar a cabo usando una centrifuga, prensa de tornillo o prensa mecánica, u otro método conocido en la técnica. La operación de extracción de zumo puede combinarse con un pretratamiento enzimático para ayudar en la liberación de compuestos polifenólicos del fruto o partes de la misma.
- En una realización, el disolvente orgánico es acetona o un alcohol tal como metanol, etanol, alcohol isopropílico o 1-propanol. Cuando se usa un solvente acuoso/orgánico, el solvente orgánico y el agua pueden usarse en cualquier proporción adecuada, tal como aproximadamente 20-90% de agua.
- En una realización, el concentrado de extracto de fruto de feijoa sustancialmente acuoso del paso iv) se fracciona poniéndolo en contacto con una resina polimérica. La resina absorbe al menos un componente del concentrado de extracto. El (los) componente(s) se pueden eluir luego de la resina con un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos para dar el extracto de feijoa de la invención.
- La resina polimérica se puede lavar opcionalmente con agua destilada antes de eluir el al menos un componente. En una realización, la resina polimérica es una resina absorbente polimérica no iónica. Preferiblemente, la resina absorbente polimérica es una resina de copolímero de estireno-divinilbenceno no iónica tal como Mitsubishi HP-20, Mitsubishi Sepabeads SP-70 o Amberlite. El ejemplo 1 proporciona un ejemplo de un método para preparar extracto de fruto de feijoa de la invención.
- Se sabe que la feijoa contiene altos niveles de polifenoles. Los polifenoles son un grupo de moléculas biológicas de amplio espectro que desempeñan un papel protector en las plantas. Generalmente caracterizado por la presencia de múltiples unidades de fenol y, a menudo, polihidroxilados, existen muchas clases diferentes de polifenoles, con una gran variedad de compuestos dentro de cada clase.
- Cada especie vegetal tendrá un perfil de polifenoles diferente y característico que también variará en cierta medida dependiendo de las condiciones ambientales en las que se cultiva. Los diferentes métodos de procesamiento también

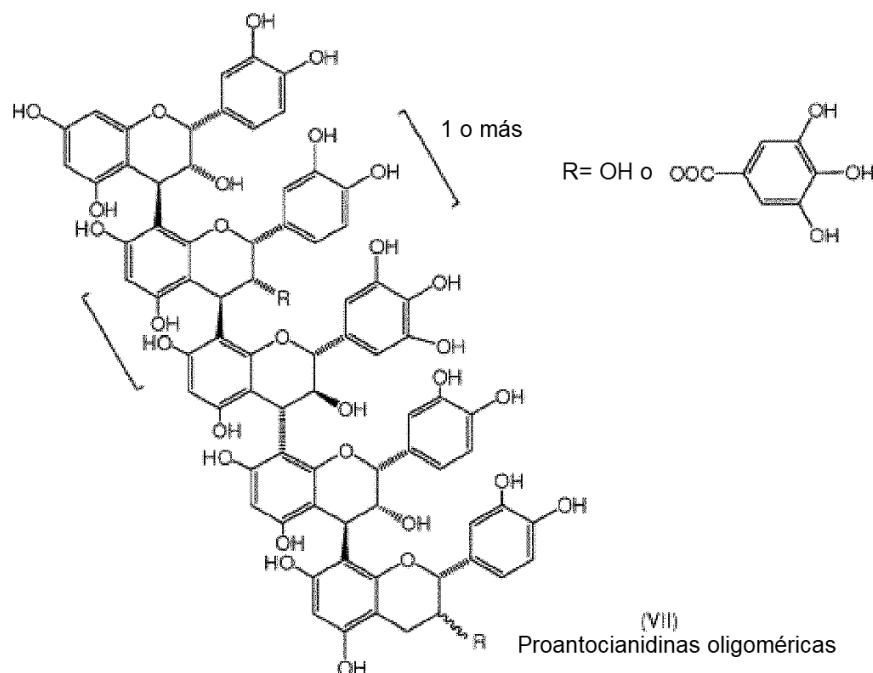
5

pueden proporcionar material vegetal con diferentes perfiles de polifenoles. Por lo tanto, no es factible identificar todos los compuestos polifenólicos en un extracto de una planta rica en polifenoles. Sin embargo, la separación cromatográfica del extracto de fruto de la invención conduce al aislamiento e identificación de catequina (III), epicatequina (IV), galocatequina (V), procianidina B2 (VI), oligómeros de proantocianidina (VII), ácido elágico, α - y β -pedunculagina, así como otros elagitaninos relacionados (véanse los compuestos (I) a (VII), a continuación) como compuestos característicos. Los componentes del extracto de fruto de feijoa preparado en el Ejemplo 1 se aíslan e identifican en el Ejemplo 2 -véanse la Tabla 1 y la Figura 1 que se refieren a trazas de HPLC del extracto de fruto de feijoa-.



20





En un aspecto, el extracto de fruto de feijoa comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: catequina, epicatequina, galocatequina, proantocianidinas, flavona, flavanoles, ácido elágico, pedunculagina y elagitaninos relacionados. Más preferiblemente, el extracto de fruto de feijoa comprende dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en: catequina, epicatequina, galocatequina, proantocianidinas, flavona, flavanoles, ácido elágico, pedunculagina y elagitaninos relacionados.

En particular, se ha demostrado que el extracto de fruto de feijoa de la invención contiene grandes proporciones de dos polifenoles grandes: proantocianidinas oligoméricas (oligómeros de proantocianidina) y elagitaninos. Estas dos clases de polifenoles actúan juntas en los extractos de la invención para proporcionar una eficacia sorprendente en el tratamiento y la prevención de la diabetes tipo 2 y la artritis reumatoide.

En un aspecto, la invención proporciona un extracto de fruto de feijoa que comprende

(a) de aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y

(b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco.

En otras palabras, cuando el extracto está sustancialmente libre de agua, aproximadamente del 40 al 70% en peso del extracto consiste en proantocianidina oligomérica.

En otro aspecto, la invención proporciona un extracto de fruto de feijoa que comprende (a) de aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de polifenoles totales.

En otras palabras, las proantocianidinas oligoméricas constituyen aproximadamente del 40 al 70% en peso del total de polifenoles presentes en el extracto.

Preferiblemente, el extracto de fruto de feijoa comprende pedunculagina y/o flavona.

En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende al menos aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% en peso de compuestos polifenólicos, sobre una base de peso seco. Preferiblemente, el extracto de fruto de feijoa comprende de aproximadamente 60 a aproximadamente 90% de compuestos polifenólicos, en peso seco.

En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende (a) de aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso (preferiblemente de aproximadamente 50 a 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, donde el extracto de fruto de feijoa comprende de aproximadamente 60 a aproximadamente 90% en peso (preferiblemente de aproximadamente 70 a aproximadamente 90% en peso) de compuestos polifenólicos, sobre una base de peso seco.

En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende (a) de aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso (preferiblemente de aproximadamente 50 a 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende de aproximadamente 60 a aproximadamente 90% en peso (preferiblemente de aproximadamente 70 a aproximadamente 90% en peso) de compuestos polifenólicos.

Ventajosamente, el extracto de fruto de feijoa de la invención se puede proporcionar a un paciente en una variedad de formas. Por ejemplo, el extracto de fruto de feijoa se puede proporcionar como nutracéutico, por ejemplo, un suplemento dietético. Alternativamente, el extracto de fruto de feijoa se puede proporcionar como producto alimenticio, por ejemplo, como parte de un alimento o bebida funcional. El extracto de fruto de feijoa de la invención se puede proporcionar como complemento de los tratamientos convencionales. Como ingrediente alimentario natural, es poco probable que produzca efectos secundarios indeseables como interferir con la eficacia de los tratamientos farmacéuticos convencionales.

Alternativamente, el extracto de fruto de feijoa se puede proporcionar como una composición farmacéutica. El extracto se puede formular en preparaciones sólidas o líquidas tales como tabletas, cápsulas, supositorios, polvos, soluciones, suspensiones y dispersiones. En algunas realizaciones, el extracto de fruto de feijoa se formula para administración oral como preparaciones sólidas o líquidas, por ejemplo, tabletas, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o dispersiones. Tales preparaciones son bien conocidas en la técnica al igual que otros regímenes de dosificación oral que no se enumeran aquí. En forma de tableta, el extracto de fruto de feijoa puede comprimirse con bases de tableta convencionales como lactosa, sacarosa y almidón de maíz, junto con un aglutinante, un agente desintegrante y un lubricante. El aglutinante puede ser, por ejemplo, almidón de maíz o gelatina, el agente desintegrante puede ser almidón de patata o ácido algínico y el lubricante puede ser estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsulas, se pueden emplear diluyentes tales como lactosa y almidón de maíz seco. Pueden añadirse otros componentes como colorantes, edulcorantes o aromatizantes.

Cuando se requieren suspensiones acuosas para su uso oral, el extracto de fruto de feijoa se puede combinar con vehículos tales como agua y etanol, y se pueden usar agentes emulsionantes, agentes de suspensión y/o tensioactivos. También se pueden añadir colorantes, edulcorantes o aromatizantes.

Los compuestos se pueden administrar además mediante sistemas de liberación sostenida. Por ejemplo, pueden incorporarse en una tableta o cápsula de disolución lenta.

Las formas líquidas incluyen vehículos tales como agua y etanol, con o sin otros agentes tales como tensioactivos o agentes de suspensión farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, la invención proporciona una unidad de dosificación que comprende aproximadamente 150 mg de extracto de fruto de feijoa.

En otro aspecto, la invención comprende una unidad de dosificación que consiste esencialmente en 150 mg de extracto de fruto de feijoa.

Preferiblemente, la unidad de dosificación es una tableta.

6.2 Uso de extracto de fruto de feijoa para regular la función inmunológica

El envejecimiento está claramente asociado con una disminución de la función inmunológica y es un factor importante que contribuye a las altas tasas de morbilidad y mortalidad en los ancianos. El extracto de fruto de feijoa de la presente invención es útil para regular la función inmunológica y/o para prevenir o tratar enfermedades asociadas con la inmunosenescencia en un paciente.

El efecto del extracto de fruto de feijoa de la presente invención sobre la función inmune de ratones se evaluó en el Ejemplo 3. Se evaluaron los cambios en la función inmunológica de ratones ancianos alimentados con dietas suplementadas con extracto de fruto de feijoa mediante la evaluación de la producción de citoquinas, mitogénesis de esplenocitos y niveles de vitamina E. IL-2, IL-4, IL-6 e IFN son citoquinas inflamatorias importantes en la producción de anticuerpos por parte de las células B y son componentes clave del sistema inmunológico adaptativo. El envejecimiento es un factor de riesgo importante para el desarrollo de diabetes y sus complicaciones y, por lo tanto, la reducción de citoquinas inflamatorias también ayuda a reducir el riesgo de diabetes. El ejemplo 3 demuestra que el extracto de fruto de feijoa suplementado a una dosis apropiada provoca un aumento significativo de la función inmunitaria de las células T esplénicas en ratones ancianos. El extracto de fruto de feijoa también aumenta los niveles de vitamina E hepática y reduce los niveles de TNF- α . La inflamación crónica de bajo grado es un evento común en los ancianos y la modulación de citoquinas proinflamatorias observada sugiere que el extracto de fruto de feijoa ayuda a tratar la inflamación crónica medida por los cambios de citoquinas. La inflamación, típicamente estimulada por la desregulación en el envejecimiento o una enfermedad con citoquinas T-auxiliares 2 elevadas, contribuye a la artritis y la diabetes. La desregulación inmunológica en los sistemas ancianos puede exacerbar la inflamación y, por lo tanto, podría acentuar la artritis reumatoide.

En un aspecto, la invención proporciona un método para regular la función inmune en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de feijoa, en donde el extracto de feijoa comprende (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la inmunosenescencia en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de feijoa, en donde el extracto de feijoa comprende (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir los niveles de citoquinas inflamatorias en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco.

En un aspecto, la invención proporciona un método para regular la función inmune en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de feijoa, en donde el extracto de feijoa comprende (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de polifenoles totales.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la inmunosenescencia en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de polifenol total.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir los niveles de citoquinas inflamatorias en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de polifenol total.

En los aspectos anteriores:

En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende de aproximadamente 60 a aproximadamente 90% de compuestos polifenólicos, con base en el peso seco.

En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende de aproximadamente 60 a aproximadamente 90% en peso de compuestos polifenólicos.

En una realización, al paciente se administran 150 mg de extracto de fruto de feijoa diariamente.

En un aspecto, la invención proporciona una unidad de dosificación para regular la función inmunitaria en un paciente, en donde la unidad de dosificación comprende aproximadamente 150 mg de extracto de fruto de feijoa.

En una realización, la unidad de dosificación es una tableta. En una realización, la unidad de dosificación debe administrarse una vez al día.

6.3 Uso de extracto de fruto de feijoa en el tratamiento y/o prevención de la obesidad, diabetes tipo 2 y enfermedades asociadas

Se ha demostrado que el extracto de fruto de feijoa de la presente invención es útil en el tratamiento y/o prevención de enfermedades y trastornos tales como los asociados con la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes de tipo 2. Las enfermedades y trastornos incluyen los asociados con presión arterial elevada, niveles elevados de glucosa en suero y/o niveles elevados de lípidos en suero, por ejemplo, hiperglucemia, hiperlipidemia e hipertensión.

Los solicitantes han demostrado sorprendentemente que la suplementación de la dieta de pacientes con diabetes de tipo 2 con extracto de fruto de feijoa reduce la presión arterial del paciente y da como resultado un mejor control de la diabetes. Los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas y HbA1c mejoran y alcanzan significación estadística en comparación con un placebo (véase el Ejemplo 4).

Sin desear limitarse a ninguna teoría, se cree que el efecto hipoglucemiante de un extracto de feijoa podría estar mediado por la inhibición de la α -glucosidasa, disminuyendo así la resorción intestinal de glucosa. Además, el extracto de fruto de feijoa de la presente invención es útil para prevenir o reducir la obesidad mediante la supresión del aumento de peso y la reducción de la relación de eficiencia alimentaria.

También se evaluó el efecto del extracto de fruto de feijoa de la presente invención sobre la obesidad y los factores de riesgo relacionados con los lípidos en ratones (véase el Ejemplo 5). Los ratones que recibieron el extracto de feijoa mostraron un menor aumento de peso corporal en comparación con el grupo de control.

5 En un aspecto, la invención proporciona un método para prevenir o tratar la diabetes tipo 2 en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa. En una realización, el paciente padece artritis reumatoide.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir los lípidos séricos en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de feijoa, en donde el extracto de feijoa comprende (a) de aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir la glucosa en suero en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso (preferiblemente aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) proantocianidina oligomérica y (b) aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir la presión arterial en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde (a) de aproximadamente el 40 a aproximadamente el 70% en peso (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) es proantocianidina oligomérica y (b) aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso es elagitaninos, sobre una base de peso seco.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir el síndrome metabólico en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende (a) de aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir los lípidos séricos en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de polifenoles totales.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir la glucosa sérica en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde (a) de aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) es proantocianidina oligomérica y (b) aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso es elagitaninos, sobre una base de polifenoles totales.

40 En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir la presión arterial en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde (a) de aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) es proantocianidina oligomérica y (b) aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso es elagitaninos, sobre una base de polifenoles totales.

45 En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir el síndrome metabólico en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende (a) de aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de polifenoles totales.

En una realización de los aspectos anteriores, el paciente es un ser humano con diabetes tipo 2.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir la diabetes tipo 2 en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de feijoa, en donde el extracto de feijoa comprende (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco.

55 En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir la diabetes tipo 2 en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de feijoa, en donde el extracto de feijoa comprende (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso (preferiblemente de aproximadamente 50 a

aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de polifenol total.

En los aspectos anteriores:

5 En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende de aproximadamente 60 a aproximadamente 90% de compuestos polifenólicos, con base en el peso seco.

En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende de aproximadamente 60 a aproximadamente 90% en peso de compuestos polifenólicos.

En una realización, al paciente se administran 150 mg de extracto de fruto de feijoa diariamente.

10 En un aspecto, la invención produce una unidad de dosificación para tratar o prevenir la diabetes de tipo 2 en un paciente, en donde la unidad de dosificación comprende aproximadamente 150 mg de extracto de feijoa.

En una realización, la unidad de dosificación es una tableta. En una realización, la unidad de dosificación debe administrarse una vez al día.

6.4 Uso de extracto de fruto de feijoa en el tratamiento y/o prevención de la artritis reumatoide

15 El extracto de fruto de feijoa de la presente invención también es útil en el tratamiento y/o prevención de enfermedades y trastornos tales como los asociados con la artritis reumatoide.

20 El efecto del extracto de fruto de feijoa de la presente invención sobre la artritis reumatoide inducida en ratones se evalúa en el Ejemplo 6. El modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) se ha utilizado ampliamente para dilucidar los mecanismos patogénicos que son relevantes para la artritis reumatoide humana y se utiliza ampliamente para la evaluación de posibles agentes antirreumáticos. La etapa aguda de la CIA se caracteriza por niveles aumentados de ARNm para citoquinas proinflamatorias en las articulaciones, como TNF- α , IL-1 β e IFN- γ . Muchas de las principales citoquinas proinflamatorias que se producen en la membrana sinovial reumatoide están vinculadas a una red o cascada con TNF- α en su vértice. Previamente se demostró que la IL-1 β es importante en la destrucción de cartílago y hueso.

25 Los estudios histológicos muestran que el extracto de fruto de feijoa protege contra la hiperplasia sinovial, un aumento en la producción de citoquinas destructivas en el líquido sinovial que puede facilitar la aparición de artritis reumatoide. Los estudios radiológicos muestran que la fruto de feijoa protege contra la deformidad de las articulaciones y la inflamación de los tejidos blandos en ratones CIA. La suplementación con extracto de fruto de feijoa también disminuye los niveles de IL-2 e IFN- γ en comparación con el grupo de control artrítico (ver Tabla 9).

30 En un aspecto, la invención proporciona un método para prevenir o tratar los síntomas de la artritis reumatoide, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de feijoa, en donde el extracto de feijoa comprende (a) de aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco.

35 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir los niveles de citoquinas inflamatorias asociadas con la artritis reumatoide, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco.

40 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir la hiperplasia sinovial asociada con la artritis reumatoide, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de feijoa, en donde el extracto de feijoa comprende (a) aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco.

45 En un aspecto, la invención proporciona un método para prevenir o tratar los síntomas de la artritis reumatoide, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende (a) de aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de polifenoles totales.

50 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir los niveles de citoquinas inflamatorias asociadas con la artritis reumatoide, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende (a) de aproximadamente 40 a aproximadamente 70% en peso, (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de polifenoles totales.

[0180] En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir la hiperplasia sinovial asociada con la artritis reumatoide, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de extracto de fruto de feijoa, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende (a) aproximadamente del 40 al 70% en peso, (preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60% en peso) de proantocianidina oligomérica y (b) de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de polifenoles totales.

En los aspectos anteriores:

En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende de aproximadamente 60 a aproximadamente 90% de compuestos polifenólicos, con base en el peso seco.

En una realización, el extracto de fruto de feijoa comprende de aproximadamente 60 a aproximadamente 90% en peso de compuestos polifenólicos.

En una realización, al paciente se administran 150 mg de extracto de fruto de feijoa diariamente.

En un aspecto, la invención proporciona una unidad de dosificación para prevenir o tratar la artritis reumatoide, en donde la unidad de dosificación comprende aproximadamente 150 mg de extracto de feijoa.

En una realización, la unidad de dosificación es una tableta. En una realización, la unidad de dosificación debe administrarse diariamente.

El extracto de fruto de feijoa se puede administrar a un paciente por una variedad de vías, incluyendo por vía oral, parenteral, por inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal o a través un depósito implantado. Preferiblemente, el extracto de fruto de feijoa se administra por vía oral, en forma de tableta. La cantidad de extracto de fruto de feijoa por administrar variará ampliamente según la naturaleza del paciente y la naturaleza y extensión del trastorno por tratar. Normalmente, la dosis diaria de extracto de fruto de feijoa para un ser humano adulto estará en el rango de menos de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 miligramos, preferiblemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2000 miligramos, más preferiblemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1000 miligramos, más preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 miligramos, más preferiblemente aproximadamente 100 a aproximadamente 500 miligramos, más preferiblemente de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 miligramos, lo más preferiblemente aproximadamente 150 miligramos. La dosis específica requerida para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores, incluida la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, etc. del paciente.

La invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe apreciarse que la invención no se limita a estos ejemplos.

7. Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de extracto de fruto de feijoa.

Se preparó el extracto de feijoa y se aisló del fruto fresco de feijoa. Se picaron en una licuadora frutos enteros de feijoa, piel, pulpa, residuos de frutos que quedaron de las operaciones de exprimido o diversas mezclas de estos. A la pulpa resultante se añadió aproximadamente un volumen igual de agua, alcohol, un disolvente orgánico miscible en agua tal como acetona o una mezcla acuosa de alcohol o disolvente orgánico. En este ejemplo, se utilizó etanol de calidad alimentaria. La mezcla se agitó ocasionalmente durante la primera hora y se dejó en remojo durante la noche. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a 40°C al vacío. El concentrado se filtró para eliminar cualquier material precipitado y luego se pasó a través de una columna de resina polimérica, Mitsubishi, HP20, en este ejemplo. Se pasó agua destilada a través de la columna para eliminar los azúcares y otros materiales polares. Los compuestos absorbidos se eluyeron de la columna con etanol y se concentraron a presión reducida para dar un concentrado oscuro. El concentrado se liofilizó para dar el extracto de feijoa como un polvo de color marrón claro. El extracto se caracterizó por HPLC usando detección de matriz de diodos (Figura 1 y Tabla 1) y detección de corriente iónica total (TOF-MS ES+). Se utiliza una columna Kinetex 2.6 μ C18 (50 x 3.0 mm) con una rata de flujo de 0.3 ml/min a 40°C.

Ejemplo 2: Determinación de componentes del extracto de fruto de feijoa

Los componentes del extracto de fruto de feijoa se aislaron mediante cromatografía en columna preparativa repetida usando cromatografía de exclusión por tamaño en Sephadex LH 20 y Mitsubishi HP20. Su identificación se determinó mediante el uso de espectroscopía de resonancia magnética nuclear y, cuando fue necesario, las estructuras químicas de los componentes eluidos se confirmaron mediante espectrometría de masas. Se elaboró un perfil de composición química de cromatografía líquida-espectrometría de masas del extracto de fruto de feijoa usando una columna Kinetex 2.6 μ C18 (50 x 3.0 mm) a 40°C con una rata de flujo de 0.3 ml/min. La mezcla de disolventes consistió en el disolvente A (H₂O + ácido fórmico al 0.1%) y el disolvente B (acetoniitrilo + ácido fórmico al 0.1%) con el programa 0-30 min, 0-100%. La detección se realizó mediante una matriz de diodos y corriente iónica total (TIC). La separación cromatográfica del extracto de fruto de feijoa condujo al aislamiento e identificación de catequina, epicatequina, galocatequina, procianidina B2, oligómeros de procianidina, ácido elágico, α - y β -pedunculagina, así como otros elagitaninos relacionados (Figura 1 y Tabla 1).

Tabla 1. HPLC de extracto de feijoa

Tiempo de retención (minutos)	Compuesto
4.40	α -pedunculagina
5.30	β -pedunculagina
5.77	catequina
6.50	galocatequina
6.80	catequina B2
6.81	epicatequina
8.30, 8.77, 9.92	elagitaninos
5.0-9.0	oligómeros de procianidina
15.3	flavona

Los diversos componentes se identificaron utilizando las técnicas que se describen a continuación.

Determinación de ácido elágico

- 5 Esto se realizó mediante hidrólisis ácida del extracto o concentrado de fruto de feijoa y posterior análisis del ácido elágico resultante por HPLC. Se transfirieron 80 μ l de extracto a un tubo de centrifuga de vidrio de 15 ml, se agregaron 250 μ l de HCl 2.6 N y el tubo se selló con un tapón de rosca. La muestra se hidrolizó por calentamiento en un baño de agua a 90°C durante 2 horas. Los tubos se retiraron y se enfriaron inmediatamente y se almacenaron a 4°C durante 1 hora. Después, los hidrolizados se extrajeron 2X con acetato de etilo (1 ml). Los extractos combinados de acetato de etilo se secaron bajo nitrógeno y se recogieron en 1 ml de metanol los cuales fueron analizados por HPLC. El pico principal en el cromatograma a 360 nm (Waters UPLC, columna Kinetex, gradiente de acetonitrilo:agua cada uno con ácido fórmico al 0.1%) fue ácido elágico. Los niveles de ácido elágico se compararon con el extracto original llevado a 4 mg/ml.

Determinación por HPLC de pedunculagina, compuestos de ácido elágico generales y flavona

- 15 La pedunculagina existe como dos formas de interconversión y generalmente se ve como dos picos principales en la parte inicial del cromatograma. La nitidez máxima aumenta cuando las muestras se preparan en agua o agua:etanol 90:10. El contenido relativo de pedunculagina se estima a partir de la integración de estos dos picos en el cromatograma a 280 nm.
- 20 Los compuestos generales de ácido elágico se ven como un conjunto de picos que eluyen en el medio del cromatograma y tienen un máximo de absorbancia a 360 nm. El contenido relativo de compuesto de ácido elágico se estima a partir de la integración de este conjunto de picos en el cromatograma a 360 nm. La flavona es un pico único al final del cromatograma con un espectro ultravioleta característico. El contenido relativo de flavonas se estima a partir de la integración de este pico en el cromatograma a 280 nm.

Determinación por HPLC de oligómeros de proantocianidina (PACO)

- 25 Este conjunto complejo de compuestos aparece en la mayoría de los cromatogramas como una joroba en gran parte del cromatograma. Sin embargo, si se usa un gradiente especial, el PACO aparece como una joroba aislada al final del cromatograma. La estimación del contenido de PACO del área del pico debajo de esta joroba es consistente con las mediciones realizadas usando otras técnicas. El contenido relativo de PACO se estima a partir de la integración de esta joroba en el cromatograma a 280 nm y la comparación.

- 30 Determinación colorimétrica de oligómeros de proantocianidina (PACO)

- Esta determinación se realizó usando el procedimiento descrito en Prior RL, Fan E, Ji H, Howell A, Nio C, Payne MJ, Reed J. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. J Sci Food Agric. 2010 90(9): 1473-8). La muestra se dejó reaccionar con 4-dimetilaminocinamaldehído (DMAC) en etanol ácido y el producto coloreado se detectó por espectroscopía de absorción. Se colocaron muestras de las soluciones de prueba (70 μ l) en una columna de los pozos de una microplaca de 96 pozos y luego se diluyeron a través de la placa mediante la adición y mezcla de un volumen igual de etanol:agua 70:30. Se añadió el reactivo DMAC (210 μ l de 50 mg en 50 ml de solución de etanol acidificada) a cada pozo y la placa se colocó inmediatamente en el lector de placas. El lector de placas se configuró para agitar la placa y leer la absorbancia a 640 nm cada minuto durante 30 minutos. La lectura de absorbancia generalmente alcanza un máximo en aproximadamente 20 minutos. Las lecturas

finales a los 30 minutos se utilizaron para los cálculos. Las curvas de dilución permitieron realizar comparaciones para la concentración y absorbancia más apropiadas (0.2-1.2 UA).

Ejemplo 3: Función inmune en ratones

- 5 Se evaluó el efecto del extracto de fruto de feijoa sobre la función inmunológica en ratones ancianos. Los ratones ancianos a las 48 semanas de edad se mantuvieron entre 20°C y 22°C al 50% de humedad durante el experimento. Los ratones se dividieron en 2 grupos y se alimentaron con las siguientes dietas: dieta básica o dieta básica suplementada con extracto de feijoa a 1.2 mg/día/ratón. El extracto de fruto de feijoa se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1. También se incluyó un tercer grupo de ratones jóvenes para comparación (sólo dieta básica). La cantidad de ingesta de alimentos y el peso corporal se registran una vez por semana.
- 10 Después de 32 semanas de alimentación, todos los ratones se sacrificaron bajo anestesia con Nembutal (0.1 mg/100 g de peso corporal). El bazo se aísla y se pesa (Tabla 2).

Tabla 2

Grupo de ratones		Peso corporal (g)	Bazo (mg)	Hígado (g)	Corazón (mg)
Edad del ratón	Tratamiento				
Joven	Dieta de pienso	26.36 ± 3.20	89.71 ± 16.25	1.46 ± 0.23	153.48 ± 14.12
Anciano	Dieta de pienso	43.08 ± 2.30	174.95 ± 15.15	1.76 ± 0.15	163.88 ± 16.81
Anciano	Extracto de fruto de feijoa	44.2 ± 3.1	133.5 ± 19.2	1.7 ± 0.2	160.2 ± 12.9

Los ratones suplementados con extracto de fruto de feijoa consumieron 6 g de alimento/día, lo que equivale a 8 mg de extracto/día. El extracto de feijoa se añadió a la dieta a una dosis de 300 mg/kg. Los datos indican la media ± DE de 6 ratones por grupo. * Muestra la significancia estadística en comparación con el control de edad determinada por la prueba t de Student no emparejada. No hubo diferencias significativas en el volumen de agua y la dieta consumidos durante el ensayo.

Ensayo ELISA para citoquinas

- 15 La producción de IL-2, IL-4, IL-6 e IFN-γ a partir de esplenocitos estimulados por mitógenos se determinó como se describió previamente (Chouaib, S.; Welte, K.; Mertelsman, R.; Dupont, B.; J. Immunol., 1985, 135, 1172-1179). Los bazo se pincharon suavemente con fórceps en el medio de cultivo produciendo una suspensión de células del bazo (CM, RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, 1 x 10⁵ unidades/l de penicilina y estreptomycin). Los glóbulos rojos se sometieron a lisis con 3 ml de regulador de lisis (regulador Tris de cloruro de amonio 0.16 mol/l, pH 7.2) a 37°C durante 5 minutos. A continuación, las células se lavaron con CM dos veces. Se
- 20 contaron las concentraciones de células y se ajustaron a 2 x 10⁶ células/ml. Los esplenocitos (0.1/pozo) se cultivaron por triplicado en placas de cultivo de fondo plano de 96 pozos. Los esplenocitos (0.1 ml/pozo) se estimularon con ConA (1 x 10⁻² g/l, 0.1 ml/pozo) para inducir la producción de IL-2, IL-4 e IFN-γ. En otras placas, se cultivaron esplenocitos con lipopolisacárido (1 x 10⁻⁶ g/L) para inducir la producción de IL-6. Estas placas se incubaron a 37°C, 5% de CO₂; el tiempo de cultivo para IL-2, IL-4 e IL-6 es de 24 horas (o 72 horas para IFN-γ). Después de la incubación,
- 25 se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -70°C. Las citoquinas se determinaron mediante ELISA en sándwich como se describió previamente usando un kit comercial.

Mitogénesis de esplenocitos

- 30 La proliferación de células T y B esplénicas se determinó mediante la incorporación de 3H-timidina según el método descrito anteriormente (Chouaib, S.; Welte, K.; Mertelsman, R.; Dupont, B.; J. Immunol., 1985 135, 1172-1179). Se cultivaron 0.1 ml de esplenocitos en CM (2 x 10⁶ células/ml) en placas cultivadas de fondo plano de 96 pozos con ConA o LPS (10 µg/ml) o sin ConA o LPS (mitogénesis espontánea). Se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% durante 48 horas y luego se pulsaron con 3H-timidina (0.5/pozo). Después de 24 horas, los sobrenadantes se recogieron mediante un recolector de muestras de células.

Medición de vitamina E

- 35 Los niveles de vitamina E en hígado de ratón se midieron por HPLC según el método descrito anteriormente (Lee, J., Jiang, S., Liang, B., Inseerra, P., Zhang, Z., Solkoff, D., Watson, R.R., Nutr. Res., 1998, 18, 327 -339). Se
- 40 homogeneizaron 0.2 g de tejido en 1 ml de agua. Se añadió hidroxitolueno butilado para prevenir la oxidación del α-tocoferol. Se extrajo α-tocoferol del homogeneizado usando pentanos, etanol y dodecil sulfato de sodio y se concentró bajo un flujo constante de nitrógeno gaseoso a 20°C. El concentrado se redisolvió en 0.5 ml de metanol y se inyectó en una columna C18 (3.9 x 150 mm). Se utilizó una fase móvil compuesta de metanol:acetato de sodio 1 mol/l en la

proporción 97:3 (en volumen) a una rata de flujo de 1.5 ml/min. El α -tocoferol, eluyó a los 22 min y se controló mediante un detector de fluorescencia (Millipore) a una longitud de onda de excitación de 290 nm y de emisión de 320 nm.

Los resultados indicaron que el extracto de fruto de feijoa ingerido por vía oral a una dosis de 1.8 mg/día por ratón anciano, disminuye la producción de células T esplénicas de IL-4, TNF- α y TNF- β . La producción de IL-2 e IFN- γ no se vio afectada significativamente ni en el grupo de control ni en el grupo que recibió el suplemento en una dosis de 1.8 mg/día. La proliferación de esplenocitos cuando es estimulada por ConA a una concentración de 2 μ g/ml también disminuyó. La suplementación con extracto de fruto de feijoa en una dosis adecuada provocó aumentos significativos en la función inmunitaria de las células T esplénicas en ratones de edad avanzada (Tabla 3).

Tabla 3

	Joven suplementado	no	Anciano suplementado	no	Anciano suplementado
Proliferación de células T (%) (anciano sin suplementar = 100)	130 $\pm$ 15*		100 $\pm$ 9		78 $\pm$ 9*
Proliferación de células B (%) (anciano sin suplementar = 100)	130 $\pm$ 8*		100 $\pm$ 4		85 $\pm$ 4*
Nivel de IL-2 por esplenocitos (pg/ml)	278 $\pm$ 26		264 $\pm$ 38		216 $\pm$ 47
Nivel de IFN- γ por esplenocitos (pg/ml)	1555 $\pm$ 12		750 $\pm$ 37		907 $\pm$ 12
Nivel de TNF- α por esplenocitos (pg/ml)	290 $\pm$ 30*		650 $\pm$ 53		450 $\pm$ 35*
Nivel de TNF- β por esplenocitos (pg/ml)	95 $\pm$ 20*		142 $\pm$ 18		70 $\pm$ 10*
Nivel de IL-4 por esplenocitos (pg/ml)	135 $\pm$ 40		165 $\pm$ 45		90 $\pm$ 30*
Niveles de MDA en tejido hepático (mol/mg de proteína)	0.12 $\pm$ 0.02*		0.325 $\pm$ 0.07		0.19 $\pm$ 0.03*
Nivel de vitamina E hepática (%) (anciano no suplementada = 100)	200 $\pm$ 26*		100 $\pm$ 9		177 $\pm$ 3*
Los datos indican la media $\pm$ DE de 6 ratones por grupo. * Muestra la significancia estadística en comparación con el control de edad determinada por la prueba t de Student no emparejada.					

Los ratones ancianos suplementados con extracto de fruto de feijoa a una dosis de 1.8 mg/día mostraron una disminución en su producción de IL-4 en un 44% (P <0.01) frente al grupo anciano sin suplementar.

Los ratones ancianos suplementados con extracto de fruto de feijoa mostraron una disminución del 20% en la mitogénesis de células T esplénicas estimulada por ConA frente a los ratones ancianos no alimentados con extracto de fruto de feijoa. De manera similar, los ratones suplementados con extracto de fruto de feijoa mostraron una disminución del 14% en la mitogénesis de células B esplénicas estimulada por LPS. Los animales ancianos a menudo tienen células B estimuladas espontáneamente, que no funcionan tan bien como las de los animales más jóvenes y también inhiben las células T. Por lo tanto, la reducción de la mitogénesis o la división celular de las células B debería ser beneficiosa para las defensas del huésped.

La inmunosenescencia (deterioro del sistema inmunológico por el avance de la edad) es un factor importante que contribuye a la supervivencia a la vejez o muerte prematura en seres humanos y animales. Algunos de los efectos adversos incluyen división celular desregulada de linfocitos T y B tras la estimulación por mitógenos in vitro, o patógenos in vivo con producción alterada de citoquinas. En los presentes estudios, los linfocitos B y T de ratones de edad avanzada se dividieron menos que los de los ratones jóvenes y los de los ratones de edad avanzada alimentados con el extracto de feijoa. Las observaciones clave sobre las citoquinas reguladoras incluyen la estimulación de INF- γ , TNF- α , - β y - γ , e IL-4 por las consecuencias de la inmunosenescencia en el envejecimiento. La reducción de estas citoquinas debido al consumo de extracto de fruto de feijoa en la dieta sugiere una mejor regulación inmunológica general, la cual puede proporcionar una mejor resistencia a las enfermedades.

La regulación inmunitaria durante la disfunción inmunitaria de las células T inmunosenescentes parece estar asociada en parte con el nivel de vitamina E. La vitamina E revierte los defectos asociados con la edad en las células T, particularmente las células T vírgenes cuyos niveles se reducen en gran medida con el envejecimiento. La vitamina E afecta directamente a las células T y también a la inhibición de PGE2. Sin desear limitarse a ninguna teoría, el solicitante plantea la hipótesis de que los efectos beneficiosos de la suplementación con extracto de fruto de feijoa que se observan sobre la inmunosenescencia que causa la disfunción inmune de las células T podrían deberse, en parte, a su capacidad para conservar el nivel celular de vitamina E. Los ratones ancianos suplementados con extracto

de fruto de feijoa mostraron un aumento del 77% en el nivel de vitamina E hepática en comparación con el grupo de prueba anciano sin suplementar (Tabla 3). El extracto de fruto de feijoa también redujo el TNF- α , el cual se sabe que se eleva durante el envejecimiento. Por lo tanto, el extracto de fruto de feijoa tiene una influencia beneficiosa para moderar las funciones inmunológicas en ancianos.

5 Ejemplo 4: Ensayo clínico en humanos para medir hipertensión, hiperlipidemia e hiperglucemia

La población de estudio consistió en hombres y mujeres, de 40 a 75 años de edad, con diabetes de tipo 2 no dependiente de insulina. Los criterios de exclusión incluyeron diabetes tipo 1; uso de cualquier suplemento que no sea un multivitamínico diario; tener alguna enfermedad importante como cáncer, asma o insuficiencia cardíaca; cualquier evento cardíaco previo; embarazo o ser madre lactante. El protocolo de este ensayo de 12 semanas, aleatorizado, 10 doble ciego y controlado con placebo fue aprobado por la junta de revisión institucional de Mashad University y se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Los sujetos del estudio fueron reclutados por la clínica de diabetes de la Universidad. Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito antes de participar en este ensayo de investigación. Los sujetos fueron asignados al azar para recibir extracto de fruto de feijoa (150 mg, una vez al día) en forma de píldora o un placebo, los cuales permanecen constantes durante todo el período de estudio. El extracto 15 de feijoa se preparó según el proceso indicado en el Ejemplo 1.

Tabla 4. Extracto de fruto de feijoa: Estudio de participantes humanos.

	Placebo	Extracto de fruto de feijoa
Número de participantes	14	20
Proporción hombre:mujer	7:7	4:16
Edad (años)	52.6	55.0
Peso (kg)	77.6	77.2
Altura (cm)	164.4	158.6
Los participantes recibieron 150 mg/persona/día del extracto de feijoa. Como se muestra en la Tabla 4 anterior, las características demográficas y clínicas son similares. La media de años de tratamiento de la diabetes fue la misma para ambos grupos. 19 de los 20 sujetos suplementados con extracto de feijoa utilizaron medicación adicional: el 95% utilizó una combinación de metformina y glibenclamida con dos participantes que utilizaron insulina. 13 de los 14 sujetos del grupo placebo utilizaron medicación adicional: el 55% utilizó metformina y glibenclamida, insulina (1 sujeto) o atenolol		

Se registraron la presión arterial y la frecuencia cardíaca al inicio y después de 12 semanas. La presión arterial y la frecuencia cardíaca se midieron en el brazo izquierdo después de 10 minutos de descanso. Los sonidos de Korotkoff 20 I y V se tomaron como presiones arteriales sistólica y diastólica, respectivamente. Se tomaron lecturas repetidas a intervalos de 2 minutos para un total de 3 mediciones sentados y se registró el promedio. Todos los tratamientos, incluidos los medicamentos antidiabéticos, se mantuvieron constantes durante todo el período de estudio. Las píldoras no utilizadas se recogieron y contaron en visitas de seguimiento mensuales para evaluar el cumplimiento de los participantes. Los cambios en los medicamentos concomitantes y los efectos adversos clínicos en las visitas de 25 seguimiento se investigaron interrogando a los participantes; no se informó de ninguno.

El análisis se realizó de acuerdo con el principio de intención de tratar. Por lo tanto, se analizaron todos los pacientes aleatorizados que recibieron al menos una dosis del tratamiento del estudio y que tenían una medición inicial y al menos una posterior. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM. Los análisis estadísticos se realizan con SPSS versión 11.5 (SPSS Institute, Chicago, IL) (Srinthall R.C., Basic statistical analysis, Boston: Allyn and Bacon; 2003, 30 550-565). La prueba de chi-cuadrado con corrección de Yates se utiliza para las variables no continuas para el estudio de prevalencia. La prueba t de Student se utiliza para evaluar la significancia estadística de las variables continuas. La prueba no paramétrica comparable (prueba U de Mann-Whitney) se sustituye cuando fallan las pruebas de normalidad e igual varianza. Se utilizó un valor de $P < 0.05$ como criterio de significación estadística. Los participantes del ensayo no mostraron cambios significativos en el perfil estándar de enzimas hepáticas debido al extracto de feijoa. 35 Además, no hay una diferencia significativa en la creatinina, la albúmina y la urea séricas (datos no mostrados) debido al extracto de feijoa. Estos datos sugieren que no se produce toxicidad.

La presión arterial sistólica inicial fue comparable para el grupo de placebo y el grupo suplementado con extracto de fruto de feijoa. No se observaron diferencias significativas en el colesterol HDL y la presión arterial diastólica. La ingesta del extracto de fruto de feijoa indujo una disminución de la presión arterial sistólica en comparación con el grupo de placebo que mostró un aumento ($P < 0.0776$). Esto indicó una mejora del control de la presión arterial sistólica con extracto de fruto de feijoa al final del período de prueba de 12 semanas en comparación con el placebo (Tabla 5). Comparativamente, los niveles de presión arterial diastólica tendieron a disminuir en el grupo que recibió el extracto de fruto de feijoa, mientras que el grupo de placebo aumentó ($P < 0.35$). 40

Tabla 5. Efecto del extracto de fruto de feijoa en sujetos humanos con diabetes tipo 2.

Variable	Placebo			Extracto de fruto de feijoa		
	Base	Semana 12	Cambio	Base	Semana 12	Cambio
Triglicéridos (mg/dL)	208.2 ± 23.5	241.9 ± 29.7	+33.6 ± 12.6	197.9 ± 28.1	159.8 ± 20.8*	-38.1 ± 20.9
Glucosa (mg/dL)	168.4 ± 8.4	181.9 ± 10.3	+13.5 ± 30.7	184.0 ± 8.2	147.7 ± 8.0*†	-36.3 ± 2.7
HbA1c (%)	7.5 ± 0.4	8.1 ± 0.4	+0.49 ± 0.19	8.6 ± 0.3	7.7 ± 0.2*	-0.86 ± 0.14
LDL-colesterol (mg/dL)	109.3 ± 37.2	116.1 ± 40.3	+6.8 ± 7.5	105.2 ± 15.2	87.2 ± 8.7	-18.1 ± 14.4
Colesterol sérico (mg/L)	194.8 ± 9.6	209.8 ± 10.1	15.0 ± 9.8	201.1 ± 9.9	183.6 ± 7.3	-17.5 ± 6.9
PA sistólica (mm Hg)	144.2 ± 0.2	142.9 ± 0.5	+0.36 ± 1.5	144.3 ± 1	137.6 ± 1.3	-6.7 ± 2.7

Analizado mediante la prueba t de Student, *P <0.001 en comparación con el valor inicial, †P <0.001 en comparación con el grupo de placebo. Las mediciones se realizaron en muestras de suero después de 8 horas de ayuno al inicio y después de 12 semanas de tratamiento. Los valores son medias ± SEM (n = 20 sujetos en el grupo de extracto de fruto de feijoa y 14 en el placebo, excepto para el colesterol LDL cuando ambos grupos son 6).

La suplementación con extracto de fruto de feijoa también redujo los valores de varias variables séricas que se usaron para evaluar el estado de salud de los diabéticos. Los sujetos que recibieron el extracto de fruto de feijoa mostraron una reducción en la glucosa sérica en ayunas mientras que el grupo de placebo mostró un aumento (P <0.0001) (Tabla 5). También se observaron cambios significativos en los niveles de HbA1c en la semana 12 del ensayo. Los niveles medios de HbA1c en el grupo tratado con extracto de fruto de feijoa disminuyeron mientras que los niveles en el grupo placebo aumentaron (P <0.0001) (Tabla 5). Además, al final del período de prueba de 12 semanas, los pacientes suplementados con extracto de fruto de feijoa muestran una marcada disminución en los triglicéridos séricos (P <0.0127), el colesterol total sérico (P <0.0887) y el colesterol LDL (P <0.157). (Tabla 5). En resumen, estos datos muestran que el extracto de fruto de feijoa puede mejorar el control de la diabetes, reducir el uso de medicamentos antihipertensivos y puede favorecer una reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular en personas con diabetes tipo 2.

Ejemplo 5: Estudio de obesidad con ratones obesos

Se adquirieron ratones macho obesos deficientes en leptina (ob/ob) (5 semanas de edad, 26 ~ 33 g) y ratones delgados C57BL/6J de tipo salvaje (WT) de SLC, Inc. (Hamamtsu, Japón). Los ratones se alojaron en condiciones controladas de temperatura (22 ± 2°C), humedad (50 ± 5%) y luz (ciclos de luz/oscuridad de 12 horas). Se dejó que los animales se aclimataran durante 1 semana antes de los experimentos. Luego, los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos de 6 ratones. Los grupos de control negativo (control genéticamente normal, C57BL/6J) y control positivo (control ob/ob) fueron alimentados con la dieta 93M normal del American Institute of Nutrition (AIN), y el otro grupo recibió dieta AIN93M que contenía extracto de feijoa a 300 mg/kg de dieta durante 16 semanas. El extracto de feijoa preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 se mezcló homogéneamente con la dieta en polvo y la dieta se administró en forma sólida. El peso corporal se mide al comienzo del experimento y en intervalos semanales durante el período de estudio de 16 semanas. La cantidad de alimentos consumidos por cada grupo se registró diariamente.

Después de 16 semanas con dietas experimentales, se sacrificaron los ratones y se recogieron los tejidos para su análisis. Se recogió sangre, se dispuso en tubos de suero y se centrifugó durante 20 min a 1.600 rpm. Los niveles séricos de triglicéridos y colesterolos totales se analizaron mediante kits comerciales (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, Estados Unidos) y se midió fluorimétricamente el colesterol de lipoproteínas de alta densidad con un kit de cuantificación (BioVision Research Products, Mountain View, CA, Estados Unidos).

Los cambios en el peso corporal durante el período experimental debido al efecto del extracto de fruto de feijoa se muestran en la Tabla 6. La suplementación con extracto de fruto de feijoa hizo disminuir significativamente la cantidad de peso ganado en un 24% en comparación con el control en ratones ob/ob. A lo largo del experimento, la ingesta de alimentos fue mayor para el grupo de control obeso que en el grupo de control. Sin embargo, los ratones obesos tanto en el grupo de control como en el grupo suplementado con extracto de fruto de feijoa consumieron volúmenes similares de alimento. El índice de eficiencia alimentaria disminuyó significativamente en un grupo de suplementación con extracto de fruto de feijoa en comparación con el grupo de control obeso.

Tabla 6. Cambios en el peso corporal en ratones obesos.

	Control de ratones normales	Control ob/ob (obesos)	Ratones ob/ob tratados con extracto de fruto de feijoa
Peso corporal inicial (g)	21.79±1.09*	32.45 ± 2.15	34.40 ± 1.96
Peso corporal final (g)	37.29 ± 3.11*	65.23 ± 3.97	59.05 ± 2.72*
Aumento de peso (g/día)	0.14 ± 0.03*	0.29 ± 0.05	0.22 ± 0.04*
Ingesta de alimentos (g/día)	3.53 ± 0.35*	5.28 ± 0.39	4.89 ± 0.58
Relación de eficiencia alimentaria(aumento de peso corporal/ingesta de alimentos) x 100	3.90 ± 0.49*	5.51 ± 0.57	4.49 ± 0.37*
Peso del corazón (g)	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Peso del riñón (g)	0.22 ± 0.02*	0.27 ± 0.02	0.25 ± 0.02
Peso del hígado (g)	1.89 ± 0.17*	4.44 ± 0.39	3.97 ± 0.31*
Peso del bazo (g)	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Peso de tejido adiposo retroperitoneal (g)	0.53±0.19*	3.15 ± 0.46	2.63 ± 0.36
Peso de tejido adiposo epididimario (g)	1.58 ± 0.26*	4.23± 0.36	3.63 ± 0.43*
Los valores son medias ± DE de 6 ratones/grupo. La media con * indica una diferencia significativa a p <0.05, en comparación con el control negativo.			

En el grupo suplementado con fruto de feijoa, los pesos del corazón, riñón y bazo no fueron significativamente diferentes en comparación con el grupo de control (Tabla 6). En ratones suplementados con extracto de fruto de feijoa, el peso del hígado fue un 10.6% menor que el del grupo de control. Para examinar el efecto de la suplementación con feijoa sobre la acumulación de grasa corporal, se midió el peso del tejido adiposo en ratones ob/ob. Los pesos de los tejidos adiposos retroperitoneal y epididimario fueron significativamente mayores en el grupo de control ob/ob en comparación con los ratones de control normales. El peso del tejido adiposo del epidídimo en el grupo de extracto de fruto de feijoa fue significativamente menor que en el grupo de control ob/ob. Sin embargo, la suplementación con extracto de feijoa no pareció tener efecto sobre el tejido adiposo retroperitoneal en el grupo suplementado con extracto de feijoa en comparación con los ratones obesos.

También se encontró que el grupo de control ob/ob tenía niveles de colesterol total y triglicéridos en suero significativamente elevados en comparación con el grupo de control normal. Sin embargo, se encontró que la suplementación con extracto de fruto de feijoa no afectó los niveles séricos de colesterol total y triglicéridos. Además, los niveles de colesterol HDL no se modificaron con la suplementación de extracto de fruto de feijoa en comparación con el grupo de control ob/ob. Se encontró que la suplementación en la dieta de ratones obesos con el extracto de fruto de feijoa reduce el nivel de colesterol total hepático en comparación con los ratones de control ob/ob; sin embargo, el nivel de triglicéridos hepáticos no se vio afectado.

Los ratones obesos alimentados con una dieta suplementada con extracto de fruto de feijoa no ganaron tanto peso corporal, mostraron una relación de eficiencia alimentaria más baja y exhibieron cambios beneficiosos significativos en los niveles de colesterol total hepático. Se presume que esta tendencia se relaciona con la supresión de la acumulación de lípidos en los tejidos adiposos. Por lo tanto, la suplementación dietética de extracto de fruto de feijoa puede afectar físicamente el aumento de peso corporal y reducir la acumulación de tejido graso.

Ejemplo 6: Estudios de artritis usando ratones con artritis inducida por colágeno.

Se adquirieron ratones macho DBA/1J (6 semanas de edad, 20-22 g) de Japan SLC, Inc. (Shizoka, Japón). Los ratones se dividieron en 4 grupos de 5 ratones por grupo y se alimentaron con la dieta 93G del American Institute of Nutrition y agua ad libitum a una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 55%. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas en condiciones libres de patógenos específicos de acuerdo con las instrucciones institucionales de la Kyung Hee University, Corea. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las pautas éticas emitidas por el Animal Care and Use committee of the College of Medicine, Seoul National University (Seúl, Corea). Los 4 grupos fueron control normal (sin artritis inducida por colágeno, sin suplementos dietéticos), control negativo (artritis inducida por colágeno que no recibió suplemento dietético), control positivo (dieta para artritis inducida por colágeno complementada con 10 mg/kg de metotrexato) y extracto de fruto de feijoa suplementado (artritis inducida por colágeno, dieta suplementada con polvo de extracto de fruto de feijoa). Los pesos corporales entre los grupos de ratones no mostraron diferencias significativas. No hubo diferencias significativas entre los volúmenes de comida y agua que se consumen entre los grupos. Esto indica que los cambios en los datos experimentales no se

debieron ni al peso corporal ni al consumo de agua y alimentos. Un ratón promedio de 25 g consumió aproximadamente 6 g de dieta por día, consumiendo 1.8 mg de extracto de fruto de feijoa. Se indujo artritis inyectando 0.1 ml de colágeno bovino de Tipo II (Chondrex, Inc., Redmond, WA, Estados Unidos) y se disolvió en ácido acético 10 mM a una concentración de 2 mg/ml agitando durante la noche a 4°C. El colágeno se emulsionó en un volumen igual de adyuvante completo de Freund que contenía *Mycobacterium tuberculosis* en un baño de agua helada. Los ratones se inyectan por vía subcutánea en la base de la cola con 0.1 ml de emulsión. Los ratones recibieron una inyección de refuerzo de colágeno el día 21 con adyuvante incompleto de Freund de 0.1 ml de emulsión. La evaluación clínica de la inflamación en las patas de los ratones se realizó visualmente 3 veces por semana entre el día 56 y el día 79 utilizando una escala de 4 puntos (0-4) para cada pata (Tabla 1). La puntuación total para la evaluación clínica se midió en cada ratón (4 puntos por pata con una puntuación máxima de 16). Se utilizó una cinta de correr modular para ratón con 10 pulgadas de superficie para correr fabricada por Columbus Instruments (Estados Unidos). La velocidad se ajusta de 6 a 100 metros por minuto para evaluar la capacidad de velocidad máxima del ratón. Las mediciones de la velocidad de carrera y la presión del pie se realizaron 3 veces por semana desde el día 56 hasta el día 79. Los ratones se sacrificaron al final de la prueba. Las rodillas de los ratones fueron removidas, congeladas y luego seccionadas. Se tiñen con hematoxilina y eosina y se fotografían como se muestra en la Figura 2. Las patas traseras se evalúan estructuralmente con imágenes tomográficas microcomputadorizadas de rayos X dentro de las articulaciones inflamadas y se fotografían con la intensidad mostrada en color. Fueron perfundidos con caucho de silicona radioopaco, la absorción de silicio se midió por micro-CT de rayos X a una resolución de 21 μm y las imágenes se analizaron en 3-D utilizando software personalizado y un escáner de micro-CT de laboratorio que consiste en una radiografía con ánodo de tungsteno tubo con un punto focal relativamente pequeño ($\sim 10 \mu\text{m}$), acoplado a un sistema detector de rayos X de alta resolución (espaciado de píxeles de $\sim 50 \mu\text{m}$). La absorción del caucho de silicona radioopaco reduce la penetración de los rayos X y cambia la intensidad del color.

La progresión de la artritis se evaluó sometiendo a los ratones a una prueba de cinta rodante y comparando los niveles de inflamación entre todos los grupos (Tabla 7 y Tabla 8). Las velocidades de carrera más lentas y las presiones más ligeras del pie son indicativos de inflamación y un intento del ratón de reducir el dolor. Como se muestra en la Tabla 7, los sujetos tratados con extracto de fruto de feijoa mostraron puntuaciones clínicas beneficiosas en comparación con el control artrítico y un valor similar en comparación con el grupo tratado con metotrexato. Como se esperaba, la velocidad de carrera fue más alta en el grupo de control normal y más baja en el grupo de control inducida por artritis (Tabla 8). De manera sorprendente y ventajosa, no hubo diferencia significativa entre el grupo tratado con metotrexato y el extracto de fruto de feijoa.

Tabla 7. Evaluación del extracto de fruto de feijoa en la inflamación de las patas en ratones inducidos por artritis

	Control normal	Control artrítico	Tratado con metotrexato	Extracto de fruto de feijoa
Puntaje clínico	11.2 $\pm$ 0.7*	5.5 $\pm$ 1.2	10.5 $\pm$ 0.7 *	9.5 $\pm$ 2.0 *
* indica una significancia estadística determinada por la prueba t de Student en comparación con el control artrítico				

Tabla 8. Efectos del extracto de fruto de feijoa sobre la velocidad de carrera y la presión del pie

Resultados de la cinta de correr	Velocidad de funcionamiento (mm/s)	Presión del pie
Control normal	133.05 $\pm$ 3.72 *	148.54 $\pm$ 2.39 *
Control artrítico	91.24 $\pm$ 2.59	136.89 $\pm$ 0.85
Tratado con Metotrexato	121.36 $\pm$ 1.69 *	141.23 $\pm$ 5.28 *
Extracto de fruto de feijoa	120.54 $\pm$ 5.42 *	143.97 $\pm$ 3.69 *
Los valores son medias $\pm$ DE de 5 ratones/grupo. *indica una diferencia significativa en p <0.05, en comparación con el control negativo		

Los ratones se sacrificaron al final del período de prueba y se examinaron las articulaciones para determinar la progresión de la artritis. La evaluación histológica de las secciones de articulaciones de ratones CIA mostró una disminución de la hiperplasia sinovial (un aumento en la producción de citoquinas destructivas en el líquido sinovial) (Figura 3). En contraste, los grupos tratados con extracto de fruto de feijoa y metotrexato tenían estructuras articulares relativamente normales con poca inflamación de los tejidos blandos (Figuras 2, 3), mientras que el control normal no mostró engrosamiento sinovial o infiltración de células inflamatorias, y las estructuras articulares se mantuvieron bien. Dado que la hiperplasia sinovial produce erosión ósea y cartilaginosa que puede facilitar la aparición de artritis reumatoide, la reducción observada en los ratones suplementados con extracto de feijoa en comparación con el control artrítico sugiere que el extracto es beneficioso para reducir los efectos y la aparición de artritis reumatoide.

Los estudios radiológicos revelaron que no había evidencia de deformidad articular o inflamación del tejido blando en el control normal. En el grupo de control artrítico se observó destrucción articular severa junto con inflamación de tejidos blandos; sin embargo, los miembros del grupo tratado con feijoa tienen estructuras articulares relativamente normales con poca inflamación de los tejidos blandos que era comparable con el grupo de ratones con metotrexato.

- 5 Para establecer si el efecto protector del extracto de fruto de feijoa estaba relacionado con la respuesta antiinflamatoria observada en los ratones CIA, se investigaron las citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-2 e INF- γ) mediante ELISA. ensayo descrito en el Ejemplo 3 (Tabla 9). Es bien sabido que tales citoquinas juegan un papel crucial en la destrucción de las articulaciones al dañar las células sinoviales dentro de la articulación. En consecuencia, una reducción de las células sinoviales dentro de la articulación da como resultado un aumento de la fricción, que, a su vez, produce inflamación y el posible desarrollo de artritis. Como se muestra en la Tabla 9, el grupo tratado con extracto de fruto de feijoa tuvo niveles significativamente más bajos de citoquinas proinflamatorias en comparación con el control artrítico y mostró valores comparables en comparación con los ratones tratados con metotrexato. La suplementación con extracto de fruto de feijoa resultó en una disminución significativa en los niveles de IL-2 e INF- γ en un 48% y 40% respectivamente en comparación con el grupo de control artrítico, lo que indica una destrucción reducida dentro de la articulación.

Tabla 9. Datos de citoquinas para ratones CIA.

	Control normal	Control artrítico	Tratado metotrexato con	Extracto de fruto de feijoa
Nivel de TNF- α por esplenocitos (pg/ml)	200 $\pm$ 22	536 $\pm$ 60	255 $\pm$ 15 *	233 $\pm$ 46 *
Nivel de IL-2 por esplenocitos (pg/ml)	50 $\pm$ 16	151 $\pm$ 12	104 $\pm$ 10	90 $\pm$ 8 *
Nivel de INF- γ por esplenocitos (pg/ml)	76 $\pm$ 12	394 $\pm$ 76	182 $\pm$ 21 *	200 $\pm$ 14 *
Los valores son medias $\pm$ DE de 5 ratones/grupo. La media con * indica una diferencia significativa a p < 0.05, en comparación con el control artrítico.				

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de fruto de feijoa, para su uso en:
 - (i) prevenir o reducir la obesidad en un paciente;
 - (ii) prevenir o tratar la hiperglucemia en un paciente; o
- 5 (iii) prevenir o mejorar los síntomas de la diabetes en un paciente asociado con hiperglucemia.
2. Extracto de fruto de feijoa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en un método para reducir la glucosa sérica en un paciente.
3. Extracto de fruto de feijoa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde se reducen los niveles de HbA1c del paciente.
- 10 4. Extracto de fruto de feijoa, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paciente es un paciente humano con diabetes tipo 2.
- 15 5. Extracto de fruto de feijoa, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: catequina, epicatequina, galocatequina, proantocianidinas, flavona, ácido elágico y pedunculagina; o más preferiblemente en donde el extracto de feijoa comprende dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en: catequina, epicatequina, galocatequina, proantocianidinas, flavona, ácido elágico y pedunculagina.
- 20 6. Extracto de fruto de feijoa, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende flavona y/o pedunculagina.
7. Extracto de fruto de feijoa, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el extracto de fruto de feijoa comprende:
 - (a) 40 a 70% en peso de proantocianidinas oligoméricas y 10 a 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco; o
 - (b) 40 a 70% en peso de proantocianidinas oligoméricas y 10 a 20% en peso de elagitaninos sobre una base de polifenoles totales.
- 25 8. Extracto de fruto de feijoa, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende
 - (a) 50 a 60% en peso de proantocianidinas oligoméricas y
 - (i) 10 a 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de peso seco; o
 - (ii) 10 a 20% en peso de elagitaninos, sobre una base de polifenoles totales.
- 30 9. Extracto de fruto de feijoa, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos 70% en peso de compuestos polifenólicos, preferiblemente al menos 80% en peso de compuestos polifenólicos.
10. Extracto de fruto de feijoa, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se prepara mediante extracción con agua o mediante extracción con agua combinada con etanol.
- 35 11. Extracto de fruto de feijoa, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se prepara mediante un método que incluye los pasos de:
 - (i) poner en contacto el fruto de feijoa entera, y/o la piel del fruto de feijoa, y/o la pulpa del fruto de feijoa y/o los residuos del fruto de feijoa del zumo del fruto de feijoa, con agua o una combinación de agua y etanol para proporcionar un extracto acuoso o extracto acuoso/orgánico hidrófilo y un residuo sólido;
 - 40 (ii) separar el extracto acuoso o el extracto acuoso/orgánico del residuo sólido para dar un extracto acuoso crudo o un extracto de fruto de feijoa acuoso/orgánico;
 - (iii) evaporar el extracto acuoso crudo o el extracto de fruto de feijoa acuoso/orgánico del paso (ii) para dar un concentrado de extracto de feijoa sustancialmente acuoso y un precipitado;
 - (iv) separar el concentrado de extracto de fruto de feijoa sustancialmente acuoso del precipitado; y
 - 45 (v) fraccionar el concentrado de extracto de fruto de feijoa sustancialmente acuoso del paso (iv) para concentrar al menos un componente del mismo.

12. Una composición nutracéutica o farmacéutica que comprende un extracto de fruto de feijoa, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y uno o más excipientes nutracéuticos o farmacéuticamente aceptables.

13. Extracto de fruto de feijoa, para su uso en:

5 (i) prevenir o tratar la hiperglucemia o prevenir o mejorar los síntomas de diabetes asociados con la hiperglucemia, en donde el extracto de fruto de feijoa es un extracto de fruto entero, que se prepara mediante extracción con agua o extracción con una combinación de etanol y agua; y

(ii) prevenir o reducir la obesidad, donde el extracto de fruto de feijoa es un extracto de fruto entero, que se prepara mediante extracción con agua o extracción con una combinación de etanol y agua.

10 14. Una unidad de dosificación para su uso en

(i) tratar o prevenir la diabetes tipo 2 en un paciente, o tratar o prevenir la hiperglucemia en un paciente, en donde la unidad de dosificación comprende aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg de extracto de fruto de feijoa, y en donde el extracto de fruto de feijoa se formula como un polvo; o

15 (ii) reducir o prevenir la obesidad en un paciente, en donde la unidad de dosificación comprende aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg de extracto de fruto de feijoa y en donde el extracto de fruto de feijoa se formula como un polvo.

15. Una unidad de dosificación para su uso de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende un extracto de fruto de feijoa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11.

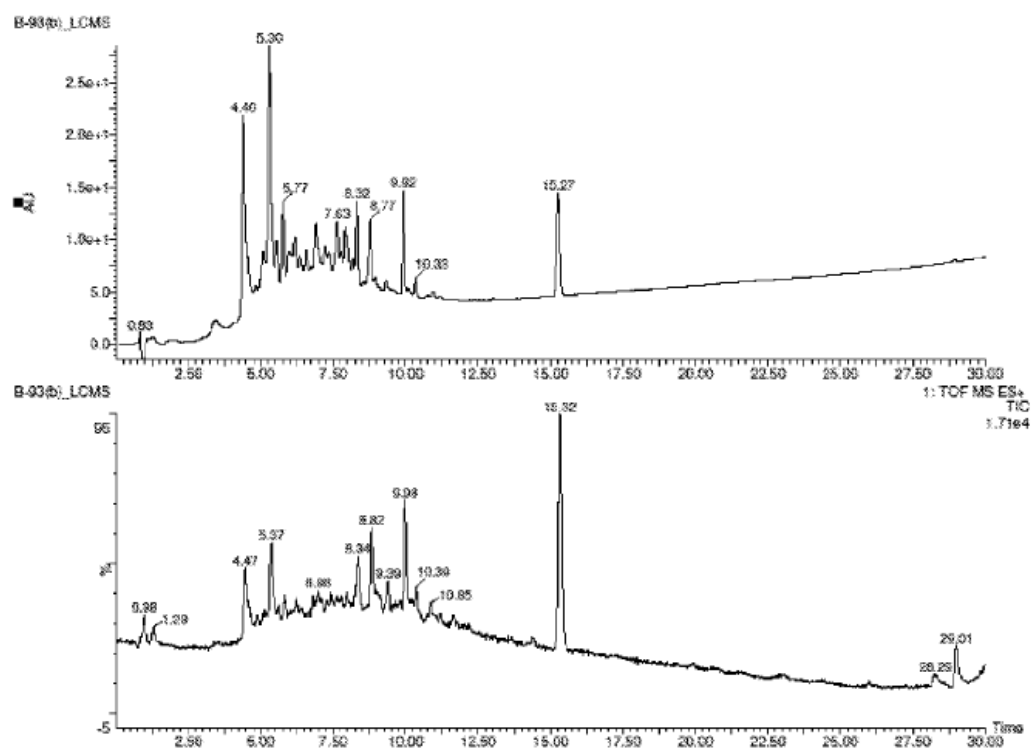


Figura 1

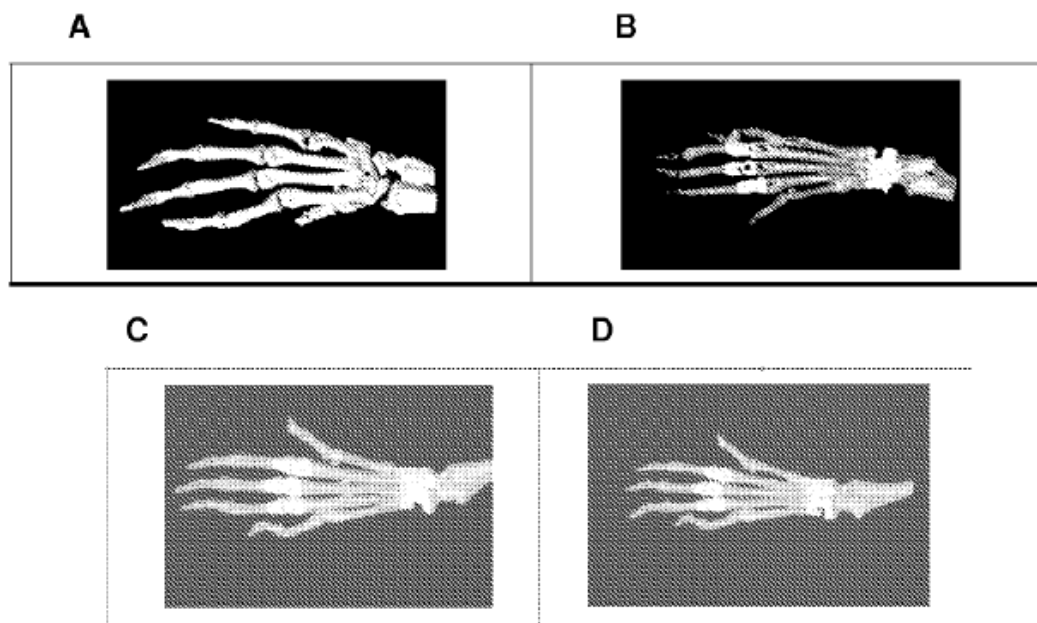


Figura 2

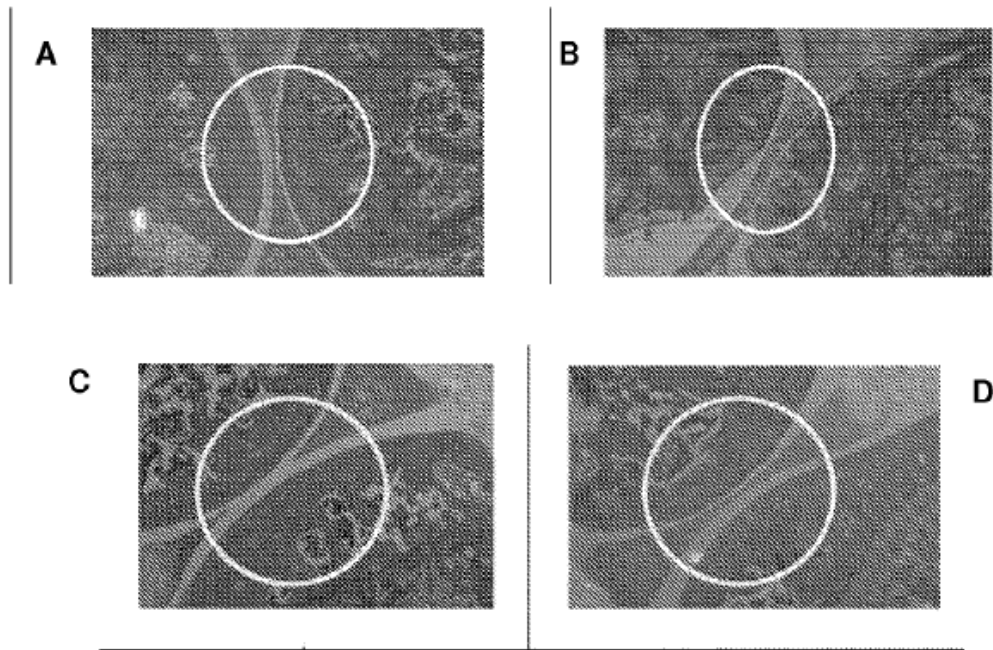


Figura 3