



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 342 018**

51 Int. Cl.:  
**A61K 36/185** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 11/06** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07251879 .8**  
96 Fecha de presentación : **04.05.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1854470**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

54 Título: **Método de tratamiento de afecciones inflamatorias usando extractos de maracuyá.**

30 Prioridad: **04.05.2006 US 417721**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.06.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.06.2010**

73 Titular/es: **Industrial Research Limited, L.L.C.**  
**Brooke House 24 Balfour Road P.O. Box 2225**  
**Auckland 1033, NZ**  
**Southwest Scientific Editing & Consulting, L.L.C.**

72 Inventor/es: **Foo, Lai Yeap;**  
**Lu, Yinrong y**  
**Watson, Ronald Ross**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 342 018 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

Método de tratamiento de afecciones inflamatorias usando extractos de meracuyá.

5 **Antecedentes de la invención**

La invención está relacionada en general con extractos botánicos y, más específicamente, con extractos de maracuyá (*Passiflora sp.*), incluyendo particularmente extractos de la piel del maracuyá, de utilidad para tratar o mejorar los síntomas de la artrosis.

La hipertensión, o una presión arterial superior a 140/90 mmHg, es el factor de riesgo más común para la morbilidad y mortalidad cardiovascular y cerebrovascular. En los Estados Unidos, la hipertensión arterial es responsable de 40.000 muertes al año, siendo al mismo tiempo el factor de riesgo más modificable para el ictus. La hipertensión afecta a aproximadamente uno de cada cuatro adultos o a casi 50 millones de personas en los Estados Unidos.

Un estudio de Framingham mostraba que a medida que la gente envejecía de los 30 a los 65 años su presión arterial aumentaba una media de 20 mmHg la presión sistólica y 10 mmHg la presión diastólica, continuando aumentando la presión arterial sistólica hasta la edad de 90.

Aunque la presión arterial superior aumenta la probabilidad de un acontecimiento cardiovascular, a menudo la hipertensión no está bien controlada y demasiados pocos pacientes están tratados adecuadamente. Los estudios epidemiológicos predicen que una reducción de la presión arterial sistémica en la cantidad que se consigue habitualmente en los ensayos clínicos más importantes podría reducir los acontecimientos cerebrovasculares el 42% y los acontecimientos cardíacos el 24%.

Con frecuencia la hipertensión se trata inespecíficamente, dando como resultado un gran número de efectos secundarios minoritarios y una frecuencia relativamente alta de no tratamiento o tratamiento inadecuado. Por lo tanto, continúa la búsqueda de nuevos tratamientos para la hipertensión.

Son bien conocidas terapias derivadas de productos naturales. Se ha establecido que ciertos flavonoides tienen un efecto beneficioso sobre la hipertensión. Por ejemplo, un extracto de corteza del pino marítimo (*Pinus pinaster*), que contiene una mezcla de flavonoides, disminuye la presión arterial sistólica cuando se toma por vía oral por pacientes levemente hipertensos.

El óxido nítrico es un regulador molecular importante de la presión arterial. El óxido nítrico es un vasodilatador potente. Inhibe la activación plaquetaria, limita la adhesión de leucocitos al endotelio y regula la contractilidad del miocardio. La síntesis de óxido nítrico catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS) se produce en el endotelio vascular, mientras que la producción de óxido nítrico que implica a la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) está asociada con la función inmunitaria. Sin embargo, pequeñas cantidades de óxido nítrico producido por otra NOS, la óxido nítrico sintasa epitelial (eNOS), tienen un efecto citoprotector y acción vasodilatadora sobre el sistema cardiovascular.

El peroxinitrito es un oxidante potencialmente perjudicial formado a partir del óxido nítrico ( $\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ONOO}^-$ ). El peroxinitrito puede causar la peroxidación de lípidos, la nitración de proteínas, la rotura monocatenaria del ADN y la nitración de guanidina.

Se ha demostrado que los flavonoides quercetina y canferol inhiben la contracción espontánea del anillo aórtico dependiente de NOLA en células de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) *in vitro*. El NOLA es un inhibidor de la óxido nítrico sintasa. También puede inhibirse la contracción vascular inducida por grandes dosis de acetilcolina por flavonoides antioxidantes tales como quercetina, canferol, rutina y esculetina. La inhibición de la contracción del músculo liso vascular debería conducir a una menor presión arterial.

Además, los efectos de los flavonoides sobre la función inmunitaria son controvertidos. La catequina potencia la proliferación de linfocitos y la producción de anticuerpos al tiempo que ejerce un efecto inhibitorio a alta concentración. Algunos estudios muestran que los flavonoides potencian la actividad de células NK, mientras que otros estudios muestran que los flavonoides no tienen efecto. La quercetina parece inhibir las respuestas inmunológicas inespecíficas y ejerce una acción antiinflamatoria.

El asma es una enfermedad muy común que afecta al 4-5% de la población de los Estados Unidos, aumentando su incidencia rápidamente. Se admite que comprende una bronquitis eosinófila crónica y un proceso inflamatorio ocasionado por mediadores en los pulmones. Estos agentes producen una broncoconstricción potente, un aumento de la permeabilidad de la membrana endotelial que conduce a edema de las vías respiratorias y una secreción aumentada de moco viscoso espeso (Wenzel S. E. Arachidonic acid metabolites: Mediators of inflammation in asthma. *Pharmacotherapy* 1997; 17 (1 Pt 2): 3S-12S). Un estrechamiento generalizado de los conductos respiratorios manifiesta el asma. Este puede aliviarse espontáneamente o como resultado de terapia y se define clínicamente por paroxismos de disnea, tos y sibilancias. El asma es una enfermedad episódica: se intercalan exacerbaciones agudas con periodos sin síntomas. Pueden desencadenar ataques de asma oxidantes, polvo orgánico, alérgenos de transmisión aérea, sustancias químicas, aire frío e infecciones víricas. La mayoría de los ataques son de corta duración, con una duración de minutos a horas, y clínicamente el paciente se recupera completamente después.

Aunque el asma es principalmente una enfermedad de las vías respiratorias, prácticamente todos los aspectos de la función pulmonar se ven comprometidos durante un ataque agudo. Cuando un paciente se presenta para terapia, la capacidad vital forzada (FVC) tiende a ser inferior al 50% de la normal. El volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV<sub>1</sub>) es de media el 30% o menos del de personas sanas y los índices de flujo espiratorio medio máximo y mínimo se reducen hasta el 20% o menos de lo esperado. En pacientes con enfermedad aguda, el volumen residual (RV) se aproxima con frecuencia al 400% del normal y la capacidad residual funcional se duplica. Los pacientes describen habitualmente que el ataque ha terminado clínicamente cuando el RV ha caído hasta el 200% de su valor esperado y el FEV<sub>1</sub> alcanza el 50% del valor esperado (American Thoracic Society: Lung function testing: Selection of referent values and interpretative strategies. Am Rev Respir Dis 1991; 144: 1202-1218).

El diagnóstico del asma se establece demostrando una obstrucción reversible de las vías respiratorias. La reversibilidad se define tradicionalmente como un aumento del 15% o superior en el FEV<sub>1</sub> después de 2 descargas de un agonista  $\beta$ -adrenérgico. Una vez que se confirma el diagnóstico, la evolución de la enfermedad y la eficacia de la terapia pueden controlarse midiendo el índice de flujo espiratorio máximo en casa o el FEV<sub>1</sub> en el laboratorio o ambos. Se logra un tratamiento con éxito del asma con el uso de un agonista  $\beta$  para la fase temprana y la reducción de la inflamación con agentes antiinflamatorios tales como glucocorticoides (que disminuyen la hipersensibilidad de las vías respiratorias) para la fase tardía.

Más de 15 millones de norteamericanos padecen osteoartritis reumatoide y artrosis. La fuente más común de discapacidad en adultos se debe a artrosis de rodilla. Los estudios han documentado artrosis de rodilla radiológica y artrosis sintomática en el 12% y el 6%, respectivamente, de las mujeres de edades comprendidas entre los 45 y los 64 años. También se ha descrito que la tasa de incidencia estandarizada por edad y sexo para la artrosis de rodilla es de aproximadamente 240 personas de cada 100.000 al año.

Aunque la artrosis no se considera una enfermedad inflamatoria, los mediadores asociados clásicamente con la inflamación perpetúan el daño de cartílago que resulta de una lesión mecánica repetida. La destrucción de cartílago, una característica patológica importante y una causa muy importante de disfunción articular, está mediada por dos rutas diferentes: la intrínseca, en la que los condrocitos son responsables de la degradación de la matriz extracelular; y la extrínseca, en la que células y tejidos distintos de condrocitos, tales como una membrana sinovial inflamada, tejido de granulación y células inflamatorias, afectan a la matriz extracelular por medio del líquido sinovial.

Se ha demostrado que las metaloproteinasas de la matriz (MMP), las enzimas proteolíticas más importantes implicadas en la renovación de la matriz extracelular, se expresan en el cartílago artrósico y contribuyen a la lesión tisular. Otro presunto mediador de daño tisular es la superproducción de óxido nítrico (NO), un factor catabólico muy importante producido por condrocitos en respuesta a citocinas proinflamatorias tales como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son las medicaciones usadas más comúnmente para la artritis, pero se asocian clínicamente con complicaciones significativas que incluyen dispepsia no ulcerosa, úlceras gástricas y duodenales sintomáticas, hemorragias y perforaciones de úlceras. Su impacto económico incluye 100.000 hospitalizaciones al año que suponen un coste de 1,6 miles de millones de dólares con 17.000 muertes. Las complicaciones de los AINE han aumentado con el envejecimiento de la población norteamericana y han aumentado el uso de aspirina para cardioprotección. Por consiguiente, existe una necesidad creciente de desarrollar un tratamiento eficaz y seguro para minimizar los acontecimientos adversos en pacientes con artrosis.

Se describen extractos de maracuyá de utilidad en la disminución de la presión arterial y de los niveles de óxido nítrico en suero en mamíferos en el documento WO 2005/097153.

El maracuyá (*Passiflora edulis*) es una planta subtropical o tropical con un carácter trepador vigoroso que crece hasta 20 pies. El maracuyá morado es originario desde el sur de Brasil, por Paraguay, hasta el norte de Argentina. Su fruto es casi redondo u ovoide, de 1,5 a 3 pulgadas de ancho con una corteza resistente, suave y cerosa.

En la búsqueda de los constituyentes bioactivos del maracuyá se ha encontrado ahora sorprendentemente que un extracto de maracuyá tiene un efecto de mejora sobre trastornos inflamatorios. La inflamación, particularmente la inflamación crónica, se ha implicado en el cáncer, la hipertensión, la alergia, la diabetes, trastornos cutáneos crónicos y enfermedades autoinmunes tales como el lupus y la esclerosis múltiple. El extracto de maracuyá disminuye la presión arterial sistólica en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y disminuye la producción de óxido nítrico de la iONS, mejorando de este modo la disfunción endotelial en las SHR. Por lo tanto, también se prevé que el extracto de maracuyá presente propiedades antioxidantes. El extracto de maracuyá disminuye la gravedad de los síntomas del asma, incluyendo las sibilancias, tos, falta de aliento y funciones espiratorias reducidas. El extracto de maracuyá disminuye la gravedad de la artrosis, incluyendo el dolor, la rigidez y la función física.

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar un extracto de maracuyá que presente efectos terapéuticos frente a la artrosis, o al menos proporcionar una alternativa útil.

### Descripción resumida de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona el uso de extracto de maracuyá que puede obtenerse de la piel de un maracuyá por extracción acuosa para tratar o mejorar los síntomas de la artrosis.

## ES 2 342 018 T3

La invención proporciona además el uso de extracto de maracuyá en la fabricación de un medicamento para tratar o mejorar los síntomas de la artrosis.

5 El extracto de maracuyá de la invención incluye, pero sin limitación, uno o más del grupo seleccionado de quercetina, glucósido de cianidina, catequina, epicatequina, luteolina, ácido fenilpirúvico, el nuevo ácido edulífico aislado y descrito en la presente memoria y cualquier glucósido del mismo.

10 Preferiblemente, el extracto de maracuyá se prepara mediante un procedimiento que incluye las siguientes etapas: preferiblemente, cortar el maracuyá en trozos para aumentar el área superficial; poner los trozos de maracuyá en contacto con agua para dar un extracto acuoso y un residuo sólido; separar el extracto acuoso del residuo sólido; poner el extracto acuoso en contacto con una matriz polimérica para adsorber uno o más componentes del extracto sobre la matriz; lavar la matriz con agua; y eluir el uno o más componentes de la matriz con un disolvente orgánico o con una mezcla de disolventes orgánicos.

15 Opcionalmente, la piel del maracuyá se separa de la carne y se usa en el procedimiento de extracción.

Se prefiere que el disolvente orgánico sea metanol, etanol, alcohol isopropílico, l-propanol o acetona.

20 La invención también proporciona el uso de una composición que contiene un extracto de maracuyá que puede obtenerse de la piel de un maracuyá por extracción acuosa con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para tratar o mejorar los síntomas de la artrosis.

25 El extracto de maracuyá para usar según la invención se administra convenientemente en una cantidad de entre 0,1 y 5 mg al día por libra de peso corporal del animal. Típicamente, la cantidad administrada al día estará en el intervalo de entre 2 mg y 1000 mg al día.

### Breve descripción de las figuras

30 Las Figuras 1a-c son análisis de trazas por HPLC del extracto de maracuyá realizados según la presente invención.

La Figura 2 es una representación esquemática de datos que muestran la reducción de la presión arterial en un grupo de ratas espontáneamente hipertensas a las que se administró el extracto de maracuyá.

35 La Figura 3 es una representación esquemática de datos que muestran la reducción de los niveles séricos de óxido nítrico en un grupo de ratas a las que se administró el extracto de maracuyá.

Las Figuras 4a y 4b son representaciones esquemáticas de datos que muestran el aumento *in vivo* de la actividad de la Na-K ATPasa y la Ca ATPasa, respectivamente, mediante el extracto de maracuyá.

40 Las Figuras 5a y 5b son una representación esquemática de datos que muestran la reducción de la presión arterial sistólica y la presión arterial diastólica, respectivamente, en un grupo de seres humanos a los que se administró el extracto de maracuyá.

45 Las Figuras 6a y 6b son dibujos que muestran interacciones de los protones H-1 del metileno con los H-1' y H-2' del resto azúcar.

Las Figuras 7a y 7b son cromatogramas de HPLC-ELSD de los extractos de piel y pulpa de maracuyá, respectivamente, obtenidos en condiciones idénticas.

50 La Figura 8 es una representación gráfica del efecto del extracto de maracuyá sobre la proporción de pacientes que tienen sibilancias, un síntoma del asma, antes y después del tratamiento; los pacientes asmáticos recibieron placebo o extracto de maracuyá (150 mg/día) durante cuatro semanas; los datos se muestran como media  $\pm$  ETM. \* $P < 0,05$  en comparación con el grupo con placebo.

55 La Figura 9 es una representación gráfica del efecto del extracto de maracuyá sobre la proporción de pacientes que tienen tos, un síntoma del asma, antes y después del tratamiento; los pacientes asmáticos recibieron placebo o extracto de PFP (150 mg/día) durante cuatro semanas; los datos se muestran como media  $\pm$  ETM. \* $P < 0,001$  en comparación con el grupo con placebo.

60 La Figura 10 es una representación gráfica del efecto del extracto de maracuyá sobre la proporción de pacientes que tienen falta de aliento, un síntoma del asma, antes y después del tratamiento; los pacientes asmáticos recibieron placebo o extracto de PFP (150 mg/día) durante cuatro semanas; los datos se muestran como media  $\pm$  ETM. \* $P < 0,005$  en comparación con el grupo con placebo.

65 La Figura 11 es una representación gráfica del efecto del extracto de maracuyá sobre el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (porcentaje del esperado), antes y después del tratamiento en pacientes asmáticos que recibieron placebo o extracto de maracuyá (150 mg/día) durante cuatro semanas; los datos se muestran como media  $\pm$  ETM.

La Figura 12 es una representación gráfica del efecto del extracto de maracuyá sobre la capacidad vital forzada (porcentaje de la esperada), antes y después del tratamiento en pacientes asmáticos que recibieron placebo o extracto de maracuyá (150 mg/día) durante cuatro semanas; los datos se muestran como media  $\pm$  ETM.

5 La Figura 13 es una representación gráfica del efecto del extracto de maracuyá sobre el índice de flujo espiratorio máximo (l/min), antes y después del tratamiento en pacientes asmáticos que recibieron placebo o extracto de maracuyá (150 mg/día) durante cuatro semanas; los datos se muestran como media  $\pm$  ETM. \* $P < 0,05$  en comparación con el grupo con placebo.

10 La Figura 14 es una representación gráfica del efecto del extracto de maracuyá sobre la subescala de dolor WOMAC antes y después del tratamiento en pacientes con artrosis que recibieron placebo o extracto de maracuyá (150 mg/día) durante un mes.

15 La Figura 15 es una representación gráfica del efecto del extracto de maracuyá sobre la subescala de rigidez WOMAC antes y después del tratamiento en pacientes con artrosis que recibieron placebo o extracto de maracuyá (150 mg/día) durante un mes.

20 La Figura 16 es una representación gráfica del efecto del extracto de maracuyá sobre la subescala de función física WOMAC antes y después del tratamiento en pacientes con artrosis que recibieron placebo o extracto de maracuyá (150 mg/día) durante un mes.

25 La Figura 17 es una representación gráfica del efecto del extracto de maracuyá sobre la puntuación compuesta WOMAC antes y después del tratamiento en pacientes con artrosis que recibieron placebo o extracto de maracuyá (150 mg/día) durante un mes.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

30 Como se describe en la presente memoria, el término “maracuyá” se refiere generalmente al fruto que incluye tanto la piel como la pulpa comestible. La expresión “piel de maracuyá” se usa para referirse a la parte restante del fruto después de que se haya retirado la pulpa comestible del interior. Las expresiones “extracto de maracuyá”, “PFP” y “extracto de PFP” se usan para referirse al extracto de maracuyá preparado según los métodos descritos en los ejemplos de las realizaciones preferidas de la presente invención. El análisis de HPLC indica que el extracto de maracuyá contiene varios flavonoides, incluyendo quercetina, galactósido de quercetina, glucósido de quercetina, luteolina, glucósido de luteolina, 3-glucósidos de cianidina, catequina y epicatequina (Figura 1).

35 Los componentes de flavonoides y cianidinas del extracto inhiben la formación de superóxido y la producción de óxido nítrico por la iNOS, mejorando de este modo la disfunción endotelial y disminuyendo la presión arterial. Se ha demostrado que la quercetina inhibe el ARNm de iNOS y la producción de óxido nítrico.

40 La hipertensión esencial humana se caracteriza por una vasodilatación dependiente del endotelio alterada causada por estrés oxidativo. El extracto de la invención tiene efectos antihipertensores. Además, los componentes de flavonoides del extracto disminuyen la presión arterial inhiben la oxidación de LDL e inhiben la agregación plaquetaria, ejerciendo de este modo una acción protectora cardiovascular. Se señala que los componentes del extracto incluyen quercetina, un compuesto que se sabe que tiene actividad antihipertensora, pero la cantidad contenida en el extracto es menor de entre aproximadamente el 1 y 5% y no es suficiente para explicar sustancialmente las actividades antihipertensoras del extracto. De hecho, ninguno de los constituyentes previamente conocidos del extracto están presentes en cantidades suficientes para proporcionar los efectos observados en solitario.

45 También se prevé, basándose en los datos *in vitro*, que el extracto tendrá propiedades antioxidantes.

50 En estudios con ratas espontáneamente hipertensas (SHR), los solicitantes encontraron que dietas complementadas con 50 mg/kg del extracto disminuían la presión arterial en SHR, retrasando su aumento normal de la presión arterial debido al envejecimiento. La presión arterial sistólica era 12,3 mmHg inferior en ratas alimentadas con 50 mg/kg del extracto en comparación con un grupo de control ( $P < 0,01$ ) (Figura 2).

55 Además, la concentración de óxido nítrico era de 18,82  $\mu\text{mol/l}$  en ratas alimentadas con 10 mg/kg del extracto, un 40% inferior a la de ratas no alimentadas con extracto. La concentración de óxido nítrico era de 11,07  $\mu\text{mol/l}$  en ratas alimentadas con 50 mg/kg del extracto, un 65% inferior a la de ratas no alimentadas con extracto (Figura 3). Esto evitará la superproducción de óxido nítrico y su posterior reacción para formar peroxinitrito que es perjudicial para el sistema cardiovascular.

60 Los solicitantes también han encontrado, en estudios de hígado de rata, que el extracto de maracuyá es hepatoprotector. Se incubaron cortes de hígado de rata cortados con precisión con 20  $\mu\text{g/ml}$  de extracto de maracuyá. A las 9 y 24 horas de incubación, los niveles de potasio en los cortes, un índice de viabilidad, no eran significativamente diferentes de los de los cortes de control.

65 Después, el extracto se incubó con cortes de hígado de rata cortados con precisión en presencia o ausencia de cloroformo 1 mM, un tóxico hepático. A las 6 horas de incubación y a las 9 horas de incubación el extracto de

## ES 2 342 018 T3

maracuyá mostraba un efecto hepatoprotector significativo frente a la lesión por cloroformo. No se encontró toxicidad del extracto en este estudio.

Los estudios *in vitro* también han demostrado que el extracto aumenta la actividad Na-K ATPasa y Ca ATPasa unida a la membrana del eritrocito humano. La bomba Na-K ATPasa unida a la membrana de RBC tenía una actividad mucho mayor cuando se cultivaba con el extracto a 0,25 mg/ml (aumentaba el 102%), 1 mg/ml (aumentaba el 107%) o 25 mg/ml (aumentaba el 170%) que el grupo de control (Figura 4). El extracto a concentraciones de 1 mg/ml y 2,5 mg/ml aumentaba la actividad Ca ATPasa unida a membrana el 78% y 41% de media.

Los solicitantes también han realizado estudios en seres humanos (Figura 5). La Figura 5 muestra el cambio en la SBP (presión arterial sistólica) y la DBP (presión arterial diastólica) en pacientes hipertensos que recibieron placebo o extracto de maracuyá (2 mg/lb/día, máximo 400 mg/día) durante cuatro semanas. Se administraron píldoras de extracto de maracuyá o placebo en forma de grupos paralelos aleatorizados doblemente a ciegas a estos pacientes. Tenían una presión arterial sistólica media de  $176,60 \pm 4,90$  mmHg (media  $\pm$  ETM). El tratamiento con maracuyá disminuyó significativamente ( $p < 0,001$ ) la presión arterial sistólica hasta  $145,67 \pm 4,44$  mmHg (media  $\pm$  ETM) en comparación con el grupo con placebo. Los datos también demostraron que la complementación con extracto de maracuyá disminuye significativamente ( $p < 0,001$ ) la presión arterial diastólica en pacientes hipertensos con una presión arterial diastólica media de  $103,27 \pm 2,30$  mmHg (media  $\pm$  ETM) hasta  $78,67 \pm 2,78$  mmHg (media  $\pm$  ETM). Ningún paciente en el estudio mostró cambios electrocardiográficos después de cuatro semanas de terapia.

Debido a las actividades descritas anteriormente, también se espera que el extracto de maracuyá beneficie a los pacientes con enfermedades relacionadas con inflamación tales como artritis, asma y alergias, así como cardiopatías e hipertensión. Además, aunque se usaron ingestas o cantidades muy grandes del extracto en los estudios descritos en esta solicitud, no se encontró toxicidad del extracto en seres humanos, ratas, ratones o células en cultivo.

Los expertos en la materia apreciarán que el extracto puede administrarse a un paciente por una diversidad de vías, incluyendo la administración oral o la inyección. La cantidad de extracto a administrar variará ampliamente dependiendo del paciente y de la naturaleza y del grado del trastorno a tratar. Típicamente, el extracto se formula como una composición que puede administrarse por vía intravenosa o por ingestión oral. La composición puede ingerirse o administrarse por vía intravenosa a cualquier nivel de dosificación y frecuencia de dosificación adecuados para mejorar los síntomas de la artrosis.

La composición de la invención también puede ser un producto alimenticio, incluyendo, pero sin limitación, un complemento nutricional.

En el caso de una composición farmacéutica, el extracto puede formularse en preparaciones sólidas o líquidas, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones y dispersiones. Las formas líquidas incluyen portadores tales como agua y etanol, con o sin otros agentes tales como tensioactivos o agentes de suspensión farmacéuticamente aceptables.

La invención se describe además con respecto a los ejemplos siguientes. Sin embargo, se apreciará que la invención no se limita a estos ejemplos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### *Preparación de Extracto de Maracuyá*

Los maracuyás (*Passiflora edulis*) se cortaron en mitades y se retiró la pulpa jugosa para obtener cáscaras vacías de piel de maracuyá. Las cáscaras se picaron en trozos pequeños de menos de 10 mm de longitud y se colocaron en un recipiente. Se añadió agua caliente (65-75°C) al recipiente para sumergir las cáscaras picadas completamente. La mezcla se agitó ocasionalmente durante la primera hora y después se dejó en remojo durante una noche. La mezcla se filtró y el filtrado pasó a través de una columna de resina polimérica no iónica para absorber el fenólico y otros compuestos orgánicos. Se pasó agua destilada a través de la columna para eliminar por lavado los azúcares y otros componentes polares. Después, los compuestos absorbidos se eluyeron de la columna con metanol y el eluyente se concentró a presión reducida para dar un concentrado oscuro. El concentrado se secó por congelación para dar el extracto de maracuyá como un polvo rojo oscuro. Aunque se usó metanol como el agente de elución, también podría haberse usado etanol, alcohol isopropílico, 1-propanol o acetona.

#### Ejemplo 2

##### *Determinación de los Componentes del Extracto de Maracuyá*

Los componentes del extracto se determinaron mediante HPLC. Los experimentos se realizaron en un instrumento Hewlett Packard 1100 equipado con un detector DAD y una columna LiChrospher 100 RP-18 ( $\mu$ m) (125 x 4) mantenida a 30°C. El programa disolvente partía de B al 3,6% (HOAC al 2% en acetonitrilo) en disolvente A (HOAC al 2% en agua) a B al 12% en 20 min, al 20% en 30 min y a B al 50% en 45 min. El caudal se ajustó a ml/min y los compuestos

## ES 2 342 018 T3

se controlaron por absorción UV ajustada a 280 nm para los ácidos fenólicos, a 350 nm para los flavonoides y a 520 nm para las antocianinas. La identidad de los compuestos se confirmó por comparación de los tiempos de retención y de los espectros UV/visible con materiales auténticos.

### 5 Ejemplo 3

#### *Preparación de Membranas de Eritrocitos y Ensayo de ATPasa*

Se prepararon membranas de eritrocitos como se ha descrito anteriormente (Farrance, ML., y Vincenzi, FF. (1977) *Biochim Biophys Acta* 471: 49-58). En resumen, se extrajo sangre de seres humanos sanos. Se lavaron los eritrocitos con solución salina y se lisaron en un tampón de imidazol hipotónico (pH 7,4, 20 mM, Sigma) con EGTA (100 mM, Sigma) y PMSF (10 mM, Sigma). Las membranas se lavaron con tampón de imidazol (20 mM) que contenía EGTA y PMSF, tampón de imidazol que contenía EGTA y tampón de imidazol solamente, una vez con cada uno de forma secuencial. El lavado final era en tampón de imidazol-histidina 40 mM (pH 7,4) y las membranas se almacenaron en un frigorífico (4-8°C) en nitrógeno. Antes del ensayo, se incubó la membrana de RBC (0,75 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C con 0, 0,25, 1, 2,5 mg/ml de extracto de piel de maracuyá y suficiente solución salina para alcanzar un volumen final de 1 ml. Después de la incubación y centrifugación, los sobrenadantes se retiraron y la membrana se resuspendió en solución salina hasta 1 ml. Después de eso, se midieron las actividades de las ATPasas de membrana simultáneamente en placas multipocillo. La mezcla de ensayo típica contenía membrana de RBC (75 µg/ml), imidazol-histidina 18 mM (pH 7,1, Sigma), MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NaCl 80 mM, KCl 15 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,2 mM, EGTA 0,1 mM, Ouabaína 0,1 mM (Sigma) y CaM 30 nM (sólo para la bomba de Ca<sup>2+</sup> activada por CaM, Sigma). Después de una preincubación de 15 minutos a 37°C, se añadió SDS al 5% (Sigma) a los grupos de control. La reacción enzimática se inició con ATP 3 mM. Después de 60 minutos a 37°C, la reacción se interrumpió con SDS al 5%; y el fosfato inorgánico liberado se midió con una mezcla de molibdato de amonio/ácido ascórbico y la absorción se midió a una longitud de onda de 820 nM mediante un Lector Automático de Microplacas (Bio-Tek Instruments, EL31 1 Estados Unidos). Para mayor precisión, se realizó un ensayo BCA para determinar la concentración final de proteína dentro de los tubos al final de cada ensayo. Se añadió membrana (25 µl) del experimento anterior, 25 µl de ddH<sub>2</sub>O y 1 ml de reactivo de color en un tubo y después se incubó durante 30 min a 37°C. Entretanto, se incubó una proteína patrón (Albúmina, Sigma) a diferentes concentraciones. Después de la incubación, cada tubo se enfrió a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de luz mediante un espectrofotómetro (Beckman Coulter, DU640) a X = 562 nm. Se leyó la concentración de proteína de la membrana a partir de la curva patrón.

La actividad de ATPasa se calculó mediante:

$$35 \quad \text{Actividad de ATPasa} = \frac{N(P1) \times 0,2778 \times \text{concentración de proteína}}{\text{Concentración de proteína inicial (0,75 mg/ml)}}$$

### 40 Ejemplo 4

#### *Animales y Dietas - Estudios de SHR*

Se mantuvieron ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de 6 semanas de edad a de 22 a 20°C y una humedad del 50% durante el experimento. Se dividieron 24 SHR en 3 grupos con 8 ratas en cada grupo. Se alimentaron con las siguientes dietas: dieta básica, dieta básica complementada con el extracto de maracuyá a 50 mg/kg o dieta básica complementada con el extracto de maracuyá a 10 mg/kg (Tabla 1). La cantidad de ingesta de alimento, el peso corporal y la presión arterial sistólica se registraron una vez por semana. Se midió la presión arterial sistólica mediante el método del manguito en la cola (Softron, Co. Ltd, Tokio, Japón). Después de 8 semanas de alimentación, todas las ratas se sacrificaron bajo anestesia con Nembutal (0,1 mg/100 g de peso corporal, Wako, Co. Ltd., Japón). Se aisló timo, bazo, hígado y corazón y se pesaron. No se observó toxicidad.

### Ejemplo 5

#### 55 *Medición de Óxido Nítrico*

Se realizó la medición de óxido nítrico como se ha descrito anteriormente (Rockett, KA., Awburn, MM., Cowden, WB. y Clark, JA. (1991) *Infect Immun* 59: 3280-3). El óxido nítrico se convierte fácilmente en nitrito. Se midió el nitrato para el óxido nítrico. Se realizaron diluciones de NaNO<sub>2</sub> (BDH; Wako, Co. Ltd., Japón) y compuestos de ensayo en agua destilada en placas de fondo plano de 96 pocillos a un volumen final de 50 µl. Se añadieron 20 microlitros de tampón borato NH<sub>4</sub>Cl a todos los pocillos que requerían análisis para el óxido nítrico/nitrito. Después se añadieron 50 µl de reactivo de Griess [sulfanilamida al 1% más diclorhidrato de N-(1-naftil)etilendiamina al 0,1% (Wako, Co. Ltd., Japón) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M] a los pocillos a analizar para determinar el óxido nítrico/nitrito. La placa se leyó a 540 nm (ensayo) y se leyeron las concentraciones de óxido nítrico y nitrito directamente a partir de una curva patrón de nitrito.

## Ejemplo 6

*Estudio de Hipertensión Humana*

5 Se incluyeron en el estudio personas con hipertensión, 14 hombres con edades de  $57,0 \pm 14,48$  años (media  $\pm$  DT) y 16 mujeres con edades de  $57,56 \pm 12,75$  años (media  $\pm$  DT). Los pacientes tenían hipertensión de fase 1 ó 2 según las directrices del Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. En mediciones de presión arterial repetidas, tenían una presión arterial sistólica (SBP) de entre 144 y 210 mmHg y una presión arterial diastólica (DBP) de entre 80 y 120 mmHg. Los criterios de exclusión incluían aquellos con enfermedad renal o cardíaca, que estuvieran tomando anticonceptivos orales, que consumieran tabaco y alcohol o que estuvieran tomando cualquier complemento vitamínico distinto de un solo comprimido multivitamínico diario. Todos los sujetos incluidos estaban tomando una terapia de combinación antihipertensora que incluía un diurético, un bloqueante beta y un inhibidor de la ACE. Se examinaron más de cien para seleccionar los treinta participantes, ninguno de los cuales se retiró durante el estudio.

15 Al comienzo del estudio, los grupos de maracuyá y placebo no diferían en la presión arterial media (SBP,  $176,60 \pm 4,90$  frente a  $179,67 \pm 3,79$  mmHg y DBP,  $103,27 \pm 2,30$  frente a  $104,33 \pm 2,06$  mmHg), edad, sexo, altura, peso, frecuencia cardíaca y medicación pretratamiento contra la hipertensión o patrón de ECG.

20 El estudio se autorizó por el Comité de Sujetos Humanos de la Universidad de Mashhad. Después de proporcionar consentimiento informado y de la retirada durante una semana de cualquier tratamiento antihipertensor previo excepto el Triamtereno-H en dos sujetos, los pacientes que cumplían los requisitos fueron admitidos en un estudio de grupos paralelos controlado con placebo doblemente a ciegas de cuatro semanas. Se pidió a los pacientes que acudieran a la clínica para un seguimiento todas las semanas durante el estudio para evaluar los efectos secundarios. Además, se midió la presión arterial y la frecuencia cardíaca. En la primera visita se realizó una historia médica completa y un examen físico incluyendo un electrocardiograma. Se midió la presión arterial por una enfermera titulada después de que el sujeto hubiera estado sentado descansando durante 10 minutos. Se tomaron las fases I y V de Korotkoff como las presiones arteriales sistólica y diastólica, respectivamente. Se tomaron lecturas repetidas a intervalos de 2 minutos para un total de 3 mediciones sentado cada visita. Se registró el promedio de mediciones repetidas en una visita dada.

25 En la segunda visita, se evaluó la presión arterial y la frecuencia cardíaca de nuevo y los pacientes se aleatorizaron para recibir una dosificación dos veces al día de 2 mg/lb/día (máxima de 400 mg/día) de una fórmula estadística de píldora de maracuyá o un placebo de aspecto similar durante 4 semanas. Los datos para la semana 1 y la semana 0 se combinaron como valores basales. En la última visita, para cada paciente se realizó un ECG y se recogió el fármaco de estudio. Se registraron todos los cambios en medicaciones concomitantes y acontecimientos adversos clínicos, ya fueran dados voluntariamente u obtenidos por interrogatorio, en las visitas inicial y de seguimiento, no describiéndose ninguno.

35 Se evaluó la conformidad por recuento de comprimidos. Durante el periodo de tratamiento de cuatro semanas todos los sujetos tomaron el 100% por cien de las píldoras proporcionadas a ciegas. Todos los ensayos se realizaron de dos a cuatro horas después del último consumo de píldoras.

## Ejemplo 7

*Aislamiento de Ácido Edulílico a partir de Extracto de Peladura de Maracuyá*

45 Se disolvió extracto de peladura de maracuyá preparado según el Ejemplo 1 en etanol acuoso al 50% y se trató en una columna Sephadex LH20 y se eluyó con etanol acuoso al 50%. Las fracciones cromatográficas se recogieron en tubos de 20 ml con ayuda de un colector de fracciones. Las fracciones se controlaron mediante cromatografía en capa fina usando TLC de celulosa revelada con ácido acético acuoso al 6% y visualizada bajo UV. En esta condición, el nuevo compuesto (Rf 0,8) coelúa con la fracción de antocianinas coloreadas (Rf 0,4-0,5). Esta fracción se recogió y se concentró y se volvió a someter a cromatografía en una columna de MCI GEL CHP 20P adquirida en Mitsubishi Chemical Industries Ltd. usando metanol acuoso al 15% como el disolvente de elución. Las fracciones se recogieron y se controlaron mediante TLC de celulosa revelada con BuOH terciario-AcOH-H<sub>2</sub>O (3/1/1 v/v). Las fracciones que contenían el nuevo compuesto (Rf 0,9 con este disolvente) se recogieron y el disolvente se evaporó y el residuo se secó por congelación.

55 Se realizó una espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electropulverización del ácido edulílico en una estación de trabajo de biospectrometría MARINER en la Universidad Victoria de Wellington, Nueva Zelanda, que funcionaba en el modo ión negativo para dar un pico (M-H)<sup>-1</sup> a 301,09691 que se correspondía con la fórmula molecular C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>. Se realizaron diversos estudios de RMN (1H, 13C, COSY, HMQC, HMBC y NOSEY) y de espectrometría de masas sobre el ácido edulílico. La Tabla 1 contiene los datos de los estudios de RMN.

65

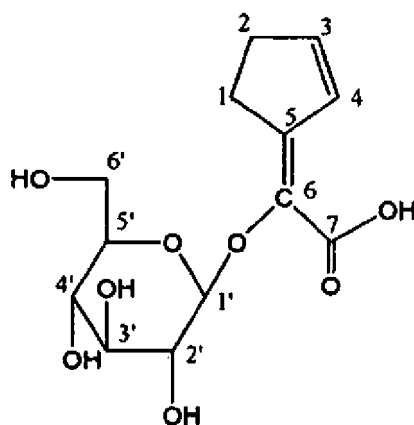
## ES 2 342 018 T3

TABLA 1

*Asignación de Espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C para Ácido Edulílico Registrados en D<sub>2</sub>O*

5	Posición C/H	δ 13C	δ1H (HMQC)	HMBC
10	1	29,1	2,70 (m)	C1, C2, C3, C4, C5, C6
	2	31,8	2,37 (sa)	C3, C4
15	3	130,1	6,84 (d)	C1, C2, C4, C5
	4	150,5	6,52 (d)	C1, C2, C3, C5
	5	156,3	-	
20	6	132,7	-	
	7	167,6	-	
	glucosa			
25	C1'	103,5	4,57 (d)	C2', C3', C6
	C2'	76,4	3,30 (m)	C2', C2', C3'
	C3'	75,9	3,35 (m)	C4'
30	C4'	73,7	3,32 (m)	C3', C4'
	C5'	69,5	3,30 (m)	C3', C4', C6'
35	C6'	60,6	3,53 (dd), 3,67 (dd)	C5'
	C7 (CO)	167,6	-	

Basándose en esto, se proporciona a continuación la estructura química del ácido edulílico. El enlace beta del resto glucosa se asigna debido a la gran magnitud de acoplamiento J (J = 7,3 Hz) del protón anomérico.



El dibujo de la molécula se preparó usando el programa informático ACD/ChemSketch que proporcionó el nombre de la IUPAC de ácido (2E)-ciclopent-2-en-1-iliden((3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)acético. El compuesto se ha identificado por toda esta memoria como "ácido edulílico", habiéndose encontrado originariamente en el fruto de *Passiflora edulis*. La estructura del ácido edulílico representada anteriormente es el isómero E o trans. Se espera que el ácido edulílico experimente una enolización cis/trans hacia la forma Z o cis y de vuelta a la anterior. El desplazamiento de electrones puede ir desde los protones C-2 a través del resto ácido acético o desde el resto ácido acético y viajar en la dirección opuesta para dar el mismo resultado cis/trans.

## ES 2 342 018 T3

El espectro NOESY del ácido edulílico en D<sub>2</sub>O muestra que existe cierta interacción del protón anomérico del azúcar con los protones de metileno en C-1 según la numeración en la estructura mostrada anteriormente (Figuras 6a y 6b). Esto sólo es posible si el resto ácido carboxílico está en el lado del doble enlace del anillo de ciclopenteno. Estudios adicionales usando un modelo Dreiding para el ácido edulílico muestran que la orientación del resto azúcar que ofrece la menor aglomeración en el anillo de ciclopenteno situaba de hecho el protón anomérico en estrecha proximidad a los protones de metileno en C-1.

### Ejemplo 8

#### *Detección de Ácido Edulílico en la Pulpa de Maracuyá*

Se preparó un extracto acuoso de pulpa de maracuyá de una forma similar a la descrita en el Ejemplo 1 con respecto a la piel y se examinó su perfil químico usando HPLC. Se usó una programación de disolvente de HPLC diferente usando metanol en lugar de acetonitrilo para resolver con éxito los picos de ácido edulílico y prunasina. Además, en lugar de detección UV se usó detección evaporativa de dispersión de luz (ELSD) para una mejor detección de compuestos de débil absorción UV tales como prunasina. Las Figuras 7a y 7b muestran los cromatogramas de HPLC de los extractos de la piel y de la pulpa, respectivamente, obtenidos en dichas condiciones. Aunque los extractos de piel y pulpa eran claramente distinguibles por su perfil de HPLC, también era evidente que tanto el ácido edulílico como la prunasina estaban presentes en ambos extractos.

### Ejemplo 9

#### *Estudio del Asma en Seres Humanos*

*Materiales y Métodos.* El Comité de Sujetos Humanos de la Universidad de Mashhad autorizó el estudio. Se incluyeron en el estudio los pacientes que cumplían los criterios de la Sociedad Torácica Americana para el asma y que cumplían los criterios de admisión. Estos incluían ser asmático y de una edad comprendida entre los 18 y los 60 años de edad, con valores del índice de flujo espiratorio forzado en un segundo (FEV<sub>1</sub>) basales del 30-75% del normal esperado, con un aumento en el FEV<sub>1</sub> de más del 15% por encima de los valores pretratamiento después de dos descargas de un agonista beta-adrenérgico. Se excluyeron los voluntarios con pruebas clínicas de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, problemas renales, hepáticos y cardíacos, enfermedades endocrinas, hipertensión o gestación. Se les permitió tomar sus medicaciones habituales excepto glucocorticoides, antagonistas de leucotrienos, multivitaminas, aspirina o cualquier AINE.

*Diseño del Estudio.* Después de proporcionar consentimiento informado los pacientes que cumplían los requisitos fueron admitidos en un estudio de grupos paralelos controlado con placebo doblemente a ciegas de cuatro semanas. Se realizó un examen físico completo y se obtuvieron los valores espirométricos basales en la visita de inclusión en el estudio. Se realizó una espirometría en cada visita siguiente. La gravedad de los síntomas se valoró en una escala de 4 puntos: síntomas leves de asma: conciencia de síntomas de asma y/o signos que eran fácilmente tolerados (puntuación 1 = sólo necesita medicina de rescate, puntuación 2 = necesita medicación diaria), síntomas moderados y dependencia de medicaciones diaria (puntuación 3), síntomas graves y dependencia de medicación diaria (puntuación 4). Se incluyeron en el estudio personas con asma. Los criterios de exclusión incluían aquellos con enfermedad renal o cardíaca, que estuvieran tomando anticonceptivos orales, que consumieran tabaco y alcohol o que estuvieran tomando cualquier complemento vitamínico distinto de un solo comprimido multivitamínico diario. Se examinaron más de cien para seleccionar a los participantes.

Se pidió a los pacientes que acudieran a la clínica para un seguimiento todas las semanas durante el estudio para evaluar los efectos secundarios. En la primera visita se realizó una historia médica completa y un examen físico incluyendo ensayos de pinchazo en la piel y de la función hepática. Una enfermera titulada midió la presión arterial después de que el sujeto hubiera estado sentado descansando durante 10 minutos. En la segunda visita, se evaluó de nuevo el aire inhalado y espirado y la falta de aliento y los pacientes se aleatorizaron para recibir la píldora de extracto de PFP 150 mg/día o una píldora de placebo de aspecto similar durante 4 semanas. Las píldoras se tomaban por la mañana. Los datos para la semana 1 y la semana 0 se combinaron como valores basales. En la última visita, para cada paciente se realizó un ECG y se recogió el extracto de estudio. Se registraron todos los cambios en medicaciones concomitantes y acontecimientos adversos clínicos, ya fueran dados voluntariamente u obtenidos por interrogatorio, en las visitas inicial y de seguimiento, no describiéndose ninguno. Se evaluó la conformidad por recuento de comprimidos. Durante el periodo de tratamiento de cuatro semanas todos los sujetos tomaron el 95% por ciento de las píldoras proporcionadas a ciegas. Todos los ensayos se realizaron de dos a cuatro horas después del último consumo de píldoras.

*Estadísticas.* Las variables de eficacia primarias eran los cambios desde las medidas basales en las puntuaciones de síntomas de asma y los ensayos de función pulmonar (FEV<sub>1</sub>% esperado, FEV<sub>1</sub>/FVC). Las variables de eficacia secundarias incluían los niveles séricos de citocinas Th1 y Th2 (IL-2 e IL-4). Los efectos de la terapia con extracto de PFP en cada sujeto y para cada parámetro se evaluaron usando una prueba *t* de dos colas para muestras relacionadas. Una probabilidad de menos de 0,05 se consideraba significativa y se confirmó con un ensayo no paramétrico, el Análisis de Varianza por Rangos de Medidas de Friedman. Ese ensayo mostraba si al menos uno de los grupos ensayados difería

de los otros grupos. La diferencia estadística significativa entre grupos experimentales se analizó mediante el método de ecuaciones de estimación generalizadas (usando el programa informático Stata) y la prueba t de Student (usando el programa informático SPSS).

5 *Resultados.* Las características demográficas incluían 13 mujeres y 6 hombres a los que se les administró placebo y 16 sujetos femeninos y 8 masculinos que tomaron píldoras de extracto de PFP. De los 44 pacientes incluidos en el estudio, 42 completaron el estudio, retirándose 2. Su edad media era de 34 años.

10 Además, la altura, el peso y la medicación pretratamiento contra el asma no diferían significativamente (no se muestran los datos). Las píldoras de extracto de PFP o placebo se administraron en forma de grupos paralelos aleatorizados doblemente a ciegas durante cuatro semanas a los pacientes con asma. Tenían un promedio de 130 a 70 mmHg (media +/- 120/70).

15 De los pacientes que tenían sibilancias como síntoma clínico sólo el 20% las tenía todavía después del tratamiento con PFP mientras que todavía las tenía el 80% en el grupo con placebo (Figura 8). De forma similar, los que tenían tos se redujeron el 85% durante el tratamiento con PFP mientras que la tos se redujo sólo el 45% en el grupo con placebo (Figura 9). Se encontró falta de aliento en el 90% de los pacientes antes del tratamiento con PFP mientras que estaba presente sólo en el 10% después (Figura 10). En los sujetos tratados con placebo, el 80% tenía falta de aliento antes del tratamiento y el 38% después, una disminución menor no significativa (Figura 10). El FEV<sup>1</sup> aumentó en los sujetos tratados con PFP y con placebo (Figura 11). Sin embargo, el aumento era estadísticamente significativo sólo en el grupo con PFP. La Capacidad Vital Forzada aumentó en los sujetos tratados con PFP y disminuyó en los sujetos tratados con placebo (Figura 12). El flujo espiratorio máximo aumentó significativamente debido al tratamiento con PFP mientras que el placebo no tuvo efecto (Figura 13).

25 *Discusión.* Los resultados de este estudio piloto indican que el extracto de PFP puede ser un ingrediente de complemento dietético valioso en el tratamiento de los síntomas del asma crónica. Los resultados principales del presente estudio son (A) que el extracto de PFP producía reducciones clínicamente y estadísticamente significativas en los síntomas del asma después de cuatro semanas de complementación en pacientes y (B) aumentaba el aire espirado forzado y el flujo de aire espiratorio máximo. Estas observaciones muestran que el PFP y sus fuertes propiedades antioxidantes  
30 tenían acciones antiinflamatorias que confirman estudios recientes en los que el PFP reducía la hipertensión grave en personas y animales. Puesto que los sujetos sólo recibieron el extracto de PFP durante 4 semanas, un tratamiento más prolongado podría aumentar sus efectos beneficiosos.

### 35 Ejemplo 10

#### *Estudio de Artrosis en Seres Humanos*

40 *Materiales y Métodos.* El Comité de Sujetos Humanos de la Universidad de Mashhad autorizó el estudio. Se incluyeron en el estudio los pacientes que cumplían los criterios del Colegio Americano de Reumatología para artrosis de rodilla primaria (grado 1 y grado 2) y que cumplían los criterios de admisión. Los incluidos tenían entre 25 y 65 años de edad, tenían un índice de subescala de dolor "WOMAC" (Índice de Artrosis de las Universidades Western Ontario y McMaster) de al menos 20 en las medias basales y tenían dolor intermitente o constante en la rodilla diana durante al menos el 50% del tiempo en los últimos tres meses que requería tratamiento médico en forma de AINE  
45 o inhibidores selectivos de la COX-2 la mayoría de los días. Los criterios de exclusión eran la existencia de artrosis secundaria debida a un trastorno conocido, artroscopia, cirugía o una inyección articular de la rodilla diana en los seis meses anteriores, historia previa de sustitución de la articulación de la rodilla, o tener cualquier enfermedad sistémica grave; o tener o cualquier otro trastorno inflamatorio crónico.

50 *Diseño del Estudio.* Después de proporcionar el consentimiento informado los pacientes que cumplían los criterios fueron admitidos en un estudio de grupos paralelos aleatorizados controlado con placebo doblemente a ciegas de un mes. Se realizó un examen físico completo y evaluación con rayos x en la visita inicial. En la segunda visita (basal) los pacientes completaron el cuestionario de WOMAC y se repartieron para recibir extracto de PFP (50 mg, tres veces al día) o placebo correspondiente. Las características basales de los sujetos de estudio se exponen en la Tabla 2.  
55

60

65

TABLA 2

*Características Basales de Sujetos del Estudio de Artrosis*

Variable	Grupo con PFP	Grupo con placebo
Número	17	16
Edad, años	55,0 ± 14,1	49,7 ± 14,0
Género, Masculino/Femenino	5/12	3/13
Puntuación WOMAC		
Dolor	22,6 ± 7,0	22,8 ± 7,8
Rigidez	11,1 ± 4,3	10,1 ± 4,4
Función física	86,6 ± 17,0	87,9 ± 25,7
Compuesta	120,3 ± 23,4	120,9 ± 33,9

En la última visita, que era un mes después de la visita inicial, el efecto del tratamiento sobre el dolor articular, la rigidez y la limitación de la función física se evaluaron usando el índice de WOMAC.

*Estadísticas.* Se realizaron análisis estadísticos con el programa SPSS versión 11.5. Los valores obtenidos a partir del grupo con PFP se compararon con el grupo con placebo usando una prueba *t* de Student. Los ensayos no paramétricos comparables (Kruskal-Wallis y el ensayo de suma de rangos) se sustituyeron cuando fallaban los ensayos para normalidad e igual varianza.

*Resultados.* Se administraron píldoras de extracto de PFP o un placebo similar a pacientes durante cuatro semanas y se evaluó la conformidad por recuento de las píldoras cada visita. Se registraron los valores del índice de WOMAC, se calculó el promedio y se realizó una evaluación estadística para cada uno de los parámetros de ensayo incluyendo dolor, rigidez, función física y una puntuación compuesta. La Figura 14 muestra que existía una disminución estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) en la subescala de dolor en pacientes tratados con el extracto de maracuyá (150 mg/día) durante cuatro semanas respecto a las medidas basales y al grupo con placebo. El parámetro de subescala de rigidez mostraba que existía una disminución estadísticamente significativa en la rigidez en el grupo con extracto de maracuyá respecto a las medidas basales pero no respecto al grupo con placebo (Figura 15). Existía una mejora estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) en la función física respecto a la basal y al grupo con placebo en el grupo con extracto de maracuyá (Figura 16). Una reducción en el valor de la subescala de función física WOMAC indica una mejora en la función física. Las puntuaciones compuestas WOMAC (dolor, rigidez y función física combinadas) también se mejoraron estadísticamente ( $P < 0,05$ ) en el grupo con extracto de maracuyá respecto a las medidas basales y al grupo con placebo después del tratamiento de cuatro semanas con 150 mg de extracto de maracuyá al día (Figura 17).

*Discusión.* Los datos del estudio piloto de artrosis muestran que el extracto de maracuyá tiene actividad en la disminución de los efectos de la artrosis en seres humanos. El índice de WOMAC es una medida validada de los parámetros de artrosis y es bien respetada en la profesión médica. La actividad del extracto de maracuyá sobre los síntomas relacionados con la artrosis se deben muy probablemente a sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes. El extracto de maracuyá podría administrarse como un ingrediente de complemento dietético para el paciente con artrosis que pueda desear una terapia alternativa a los AINE o que pueda querer complementar su dieta para mejorar su salud general.

La descripción anterior y los dibujos comprenden realizaciones ilustrativas de las presentes invenciones. Las realizaciones anteriores y los métodos descritos en la presente memoria pueden variar basándose en la capacidad, experiencia y preferencia de los expertos en la materia. La simple enumeración de las etapas del método en cierto orden no constituye ninguna limitación del orden de las etapas del método. La descripción anterior y los dibujos simplemente explican e ilustran la invención y la invención no se limita a los mismos excepto en la medida en que la limiten las reivindicaciones. Los expertos en la materia que tengan delante la descripción serán capaces de realizar modificaciones y variaciones en la misma sin alejarse del alcance de la invención.

**REIVINDICACIONES**

5 1. Extracto obtenible de la piel de un maracuyá mediante extracción acuosa para el uso en el tratamiento o la mejoría de los síntomas de la osteoartritis en un mamífero.

2. Extracto para el uso según se define en la reivindicación 1, en el que el mamífero es un ser humano.

10 3. Uso de un extracto obtenible de la piel de un maracuyá mediante extracción acuosa en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento o mejoría de los síntomas de la osteoartritis.

4. Composición farmacéutica que comprende un extracto obtenible de la piel de un maracuyá mediante extracción acuosa en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable para el uso en el tratamiento o la mejoría de los síntomas de la osteoartritis.

15 5. Uso de una composición farmacéutica que comprende un extracto obtenible de la piel de un maracuyá mediante extracción acuosa en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento o mejoría de los síntomas de la osteoartritis.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figs 1a-c

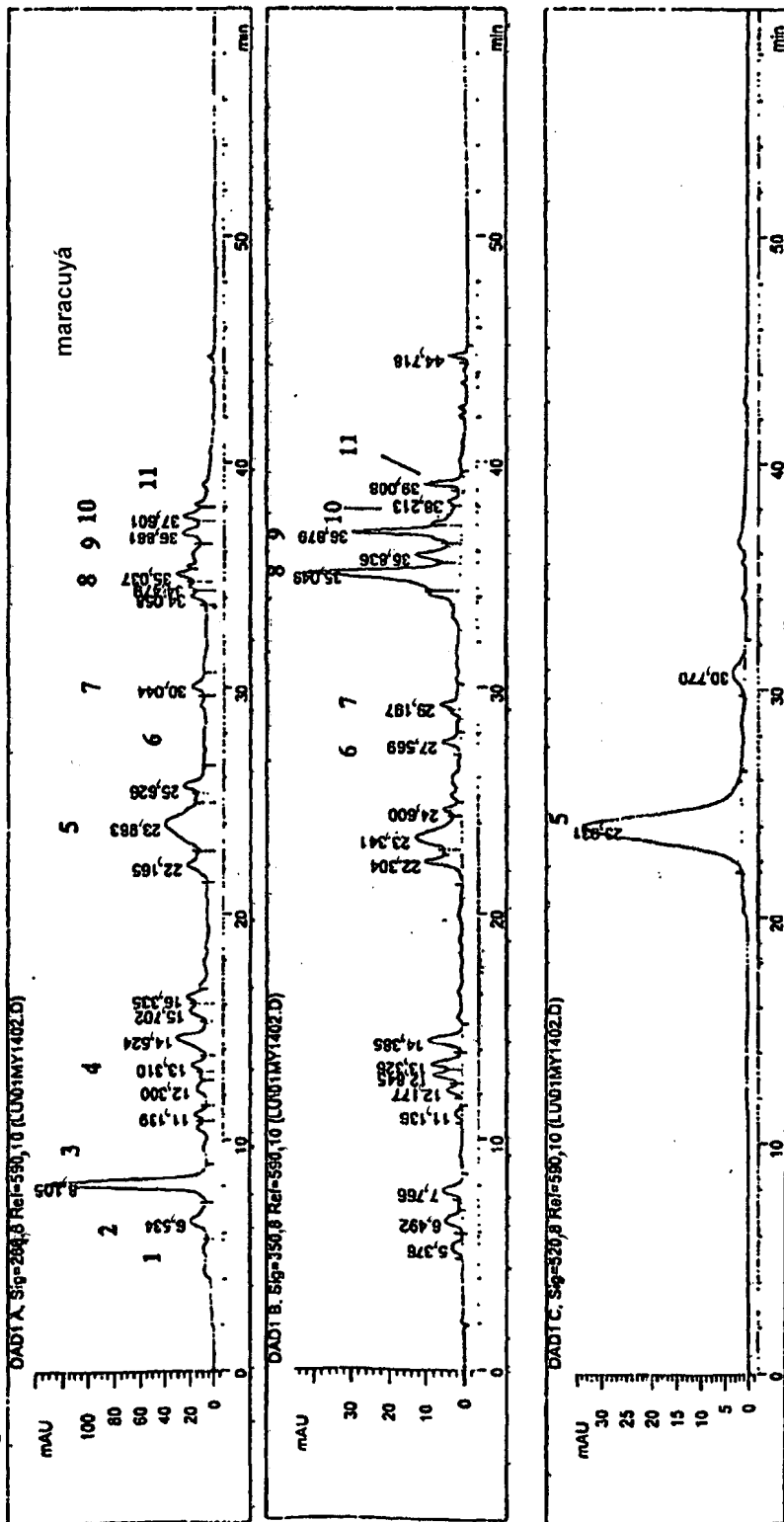


FIG. 2

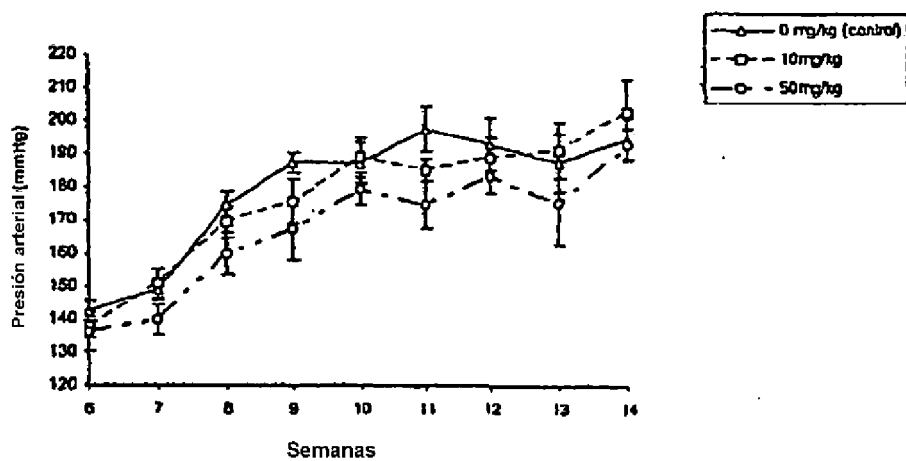


FIG. 3

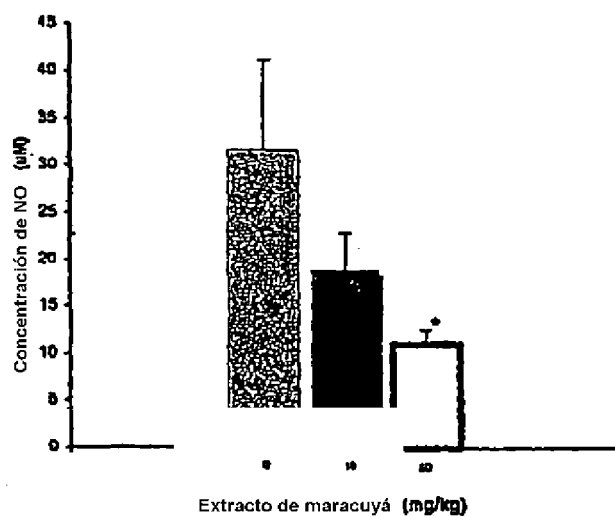


FIG. 4a

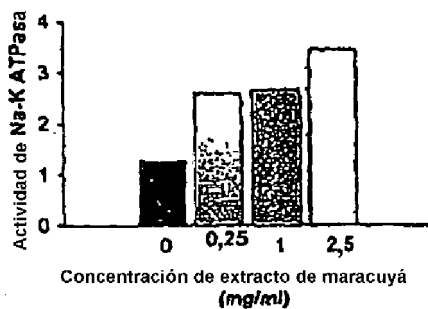


FIG. 4b

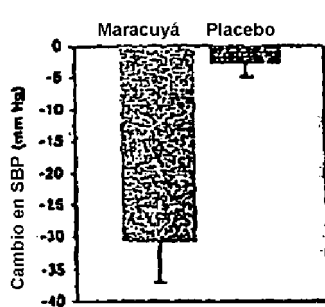
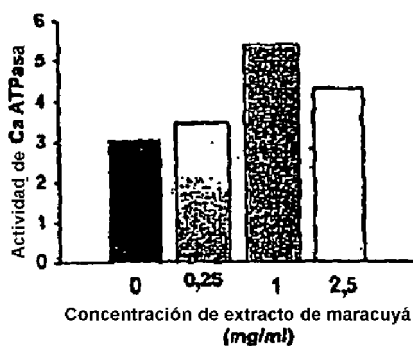


FIG. 5a

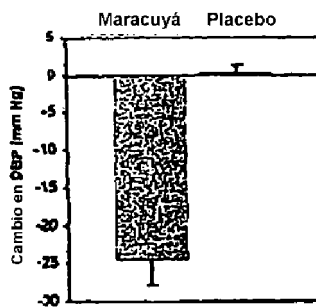


FIG. 5b

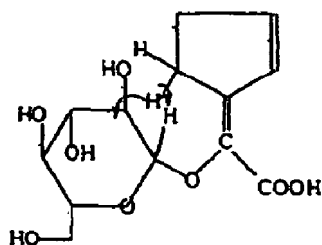


Fig. 6a

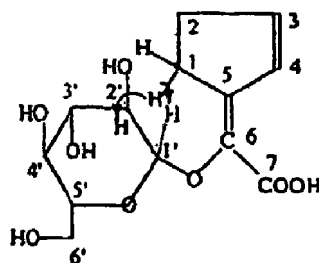


Fig. 6b

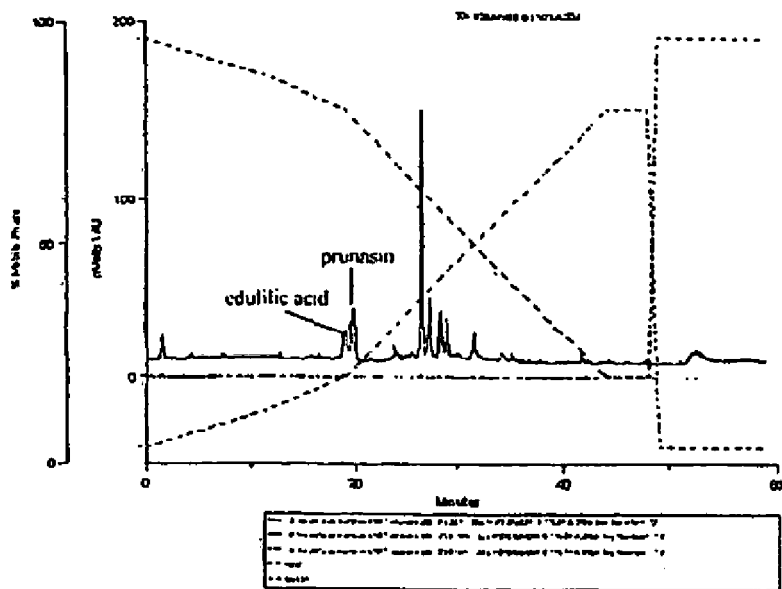


Fig. 7a

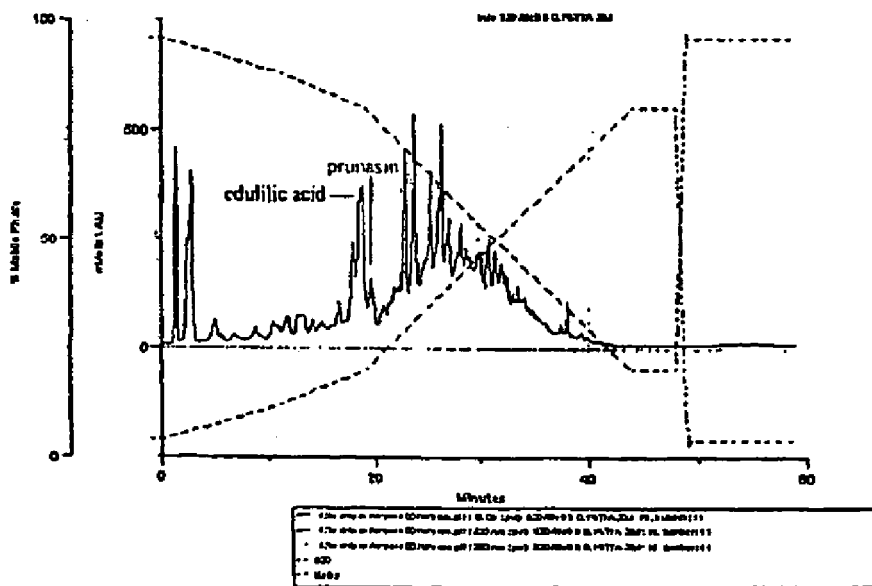


Fig. 7b

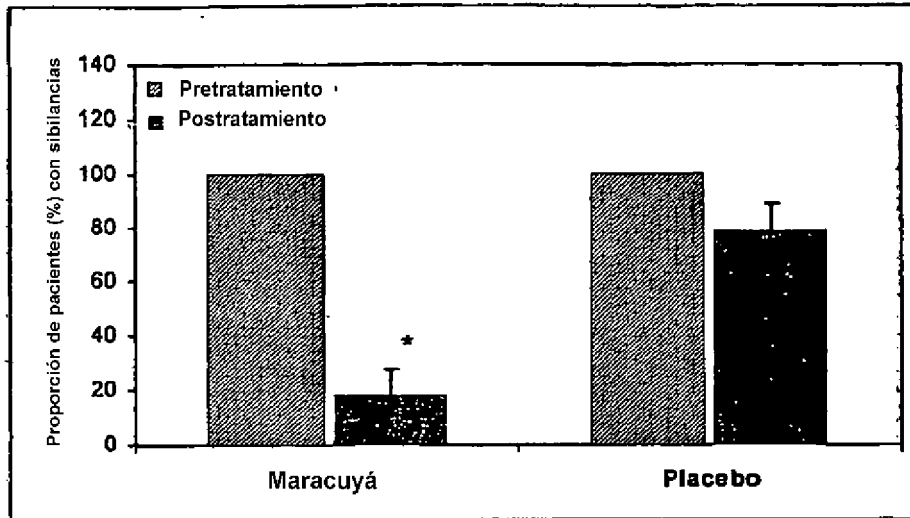


FIG. 8

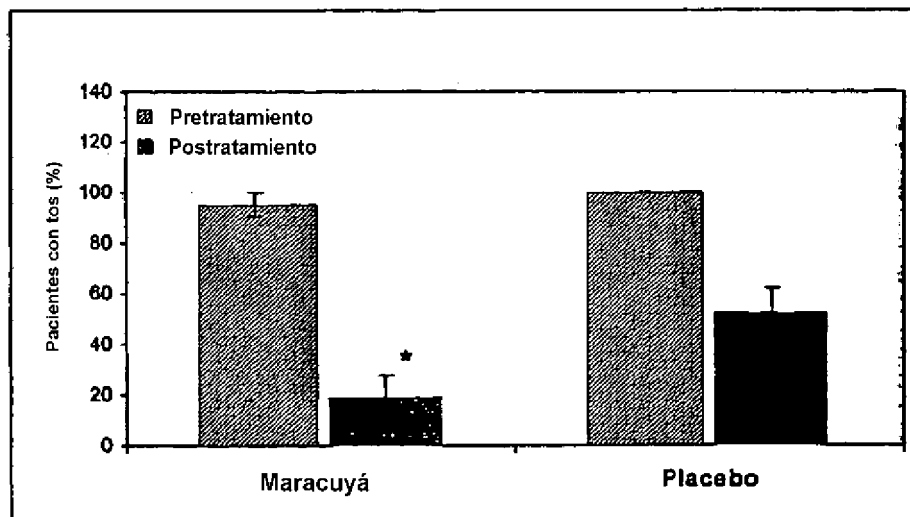


FIG. 9

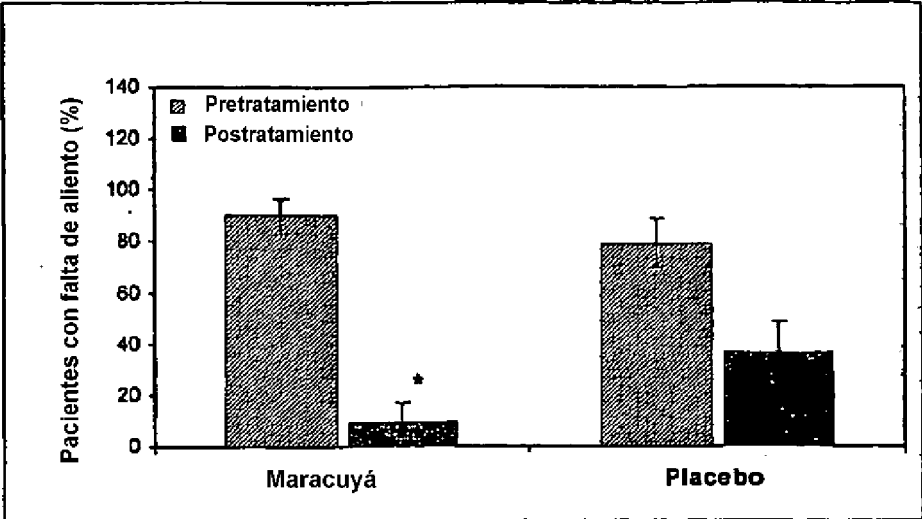


FIG. 10

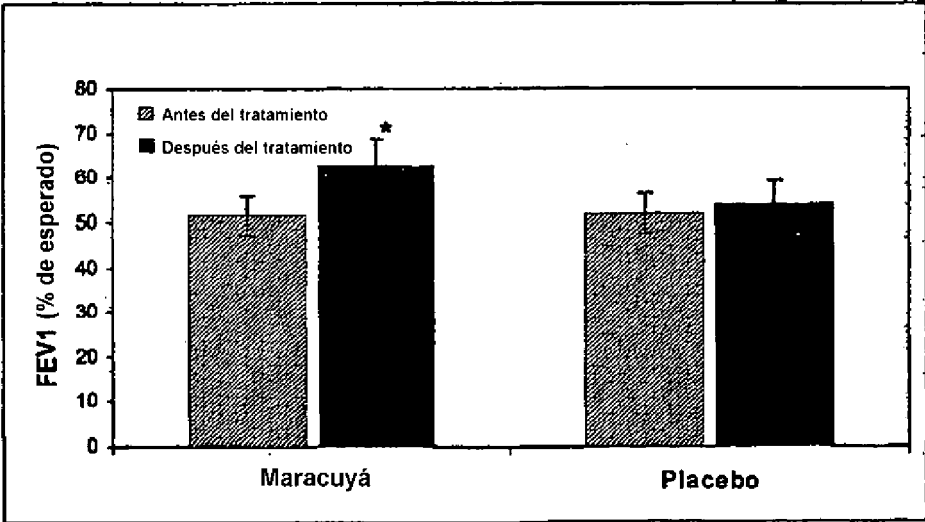


FIG. 11

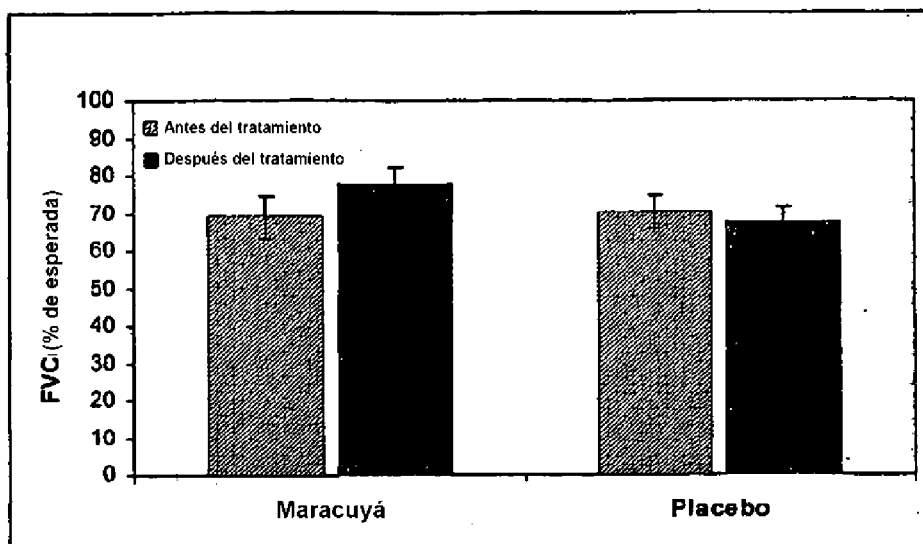


FIG. 12

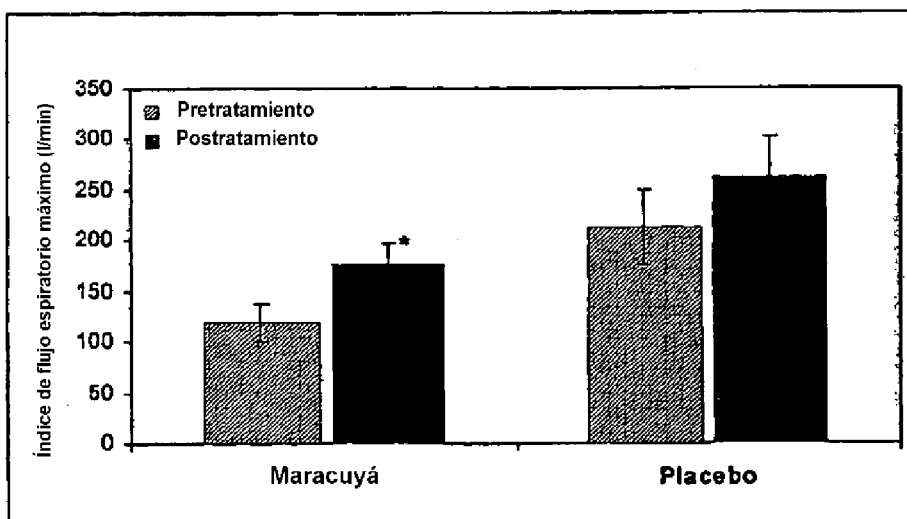


FIG. 13

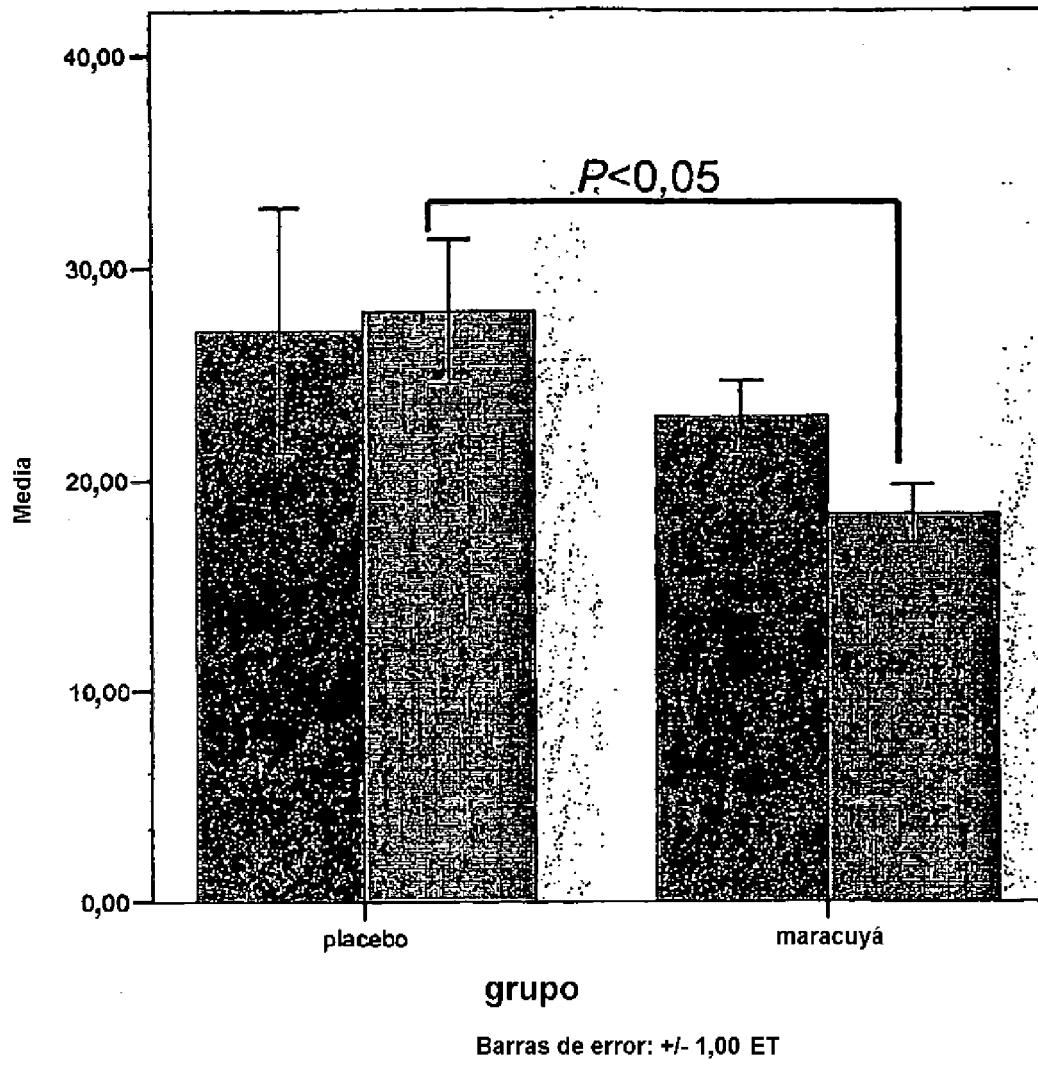


FIG. 14

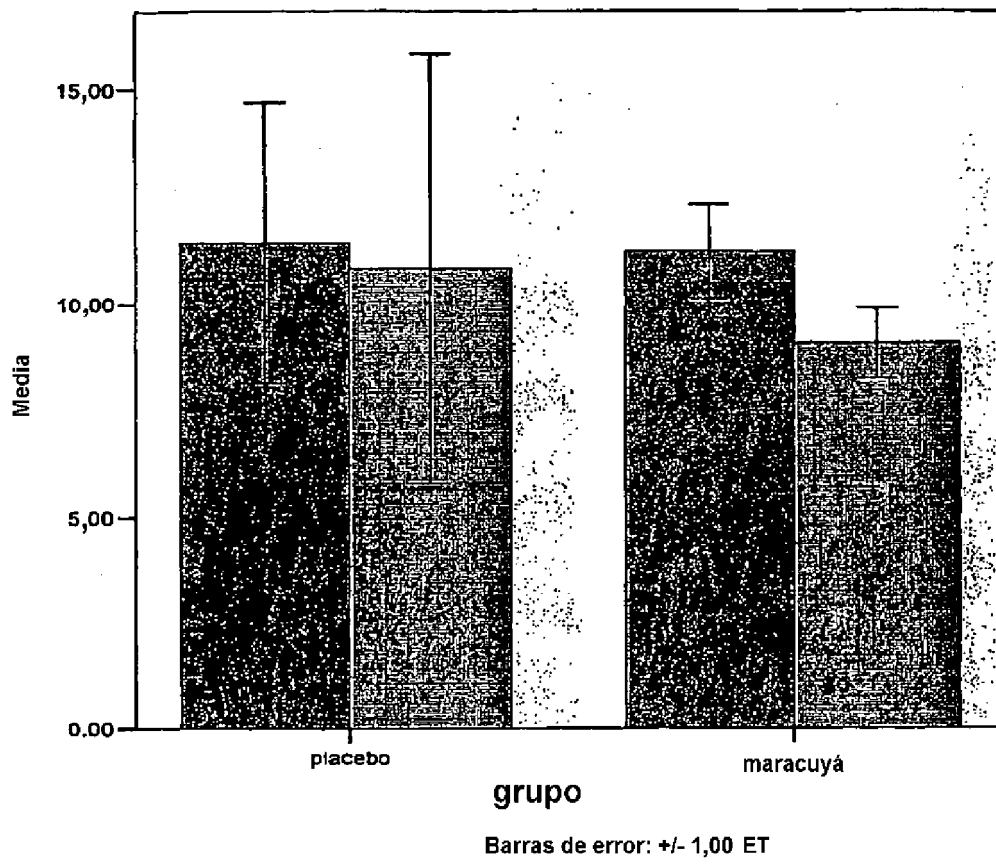


FIG. 15

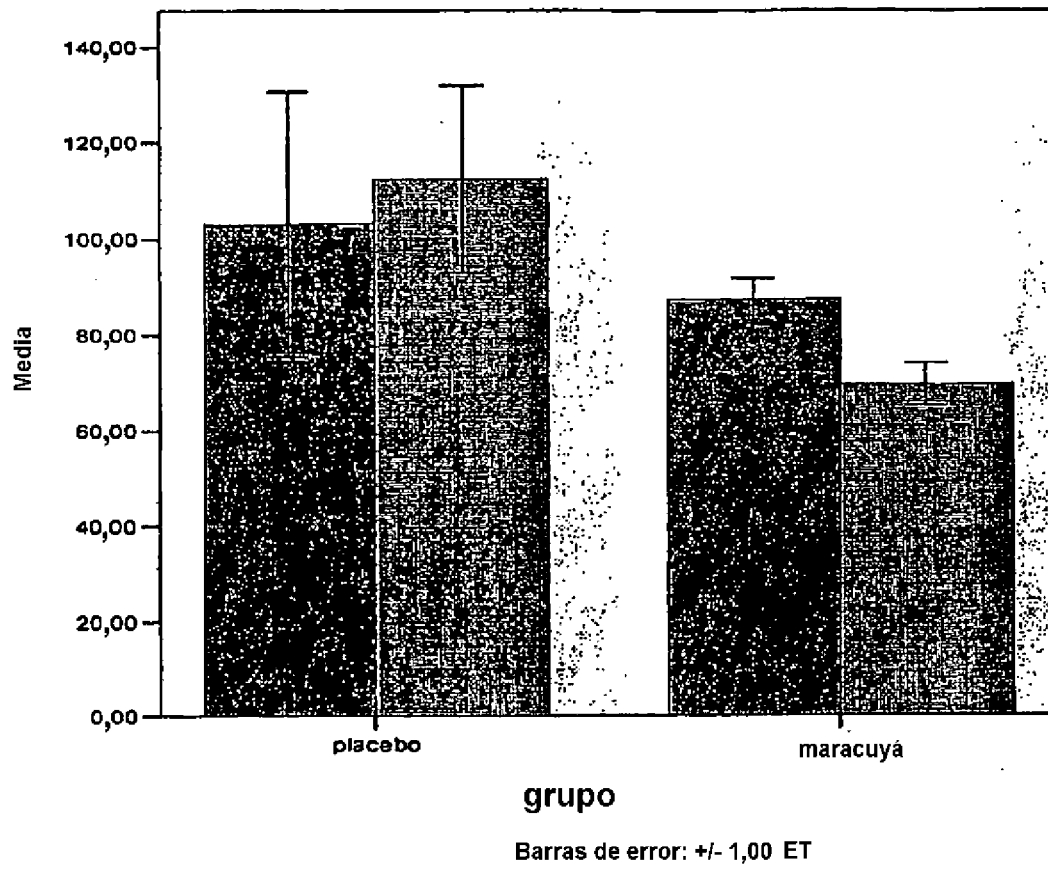


FIG. 16

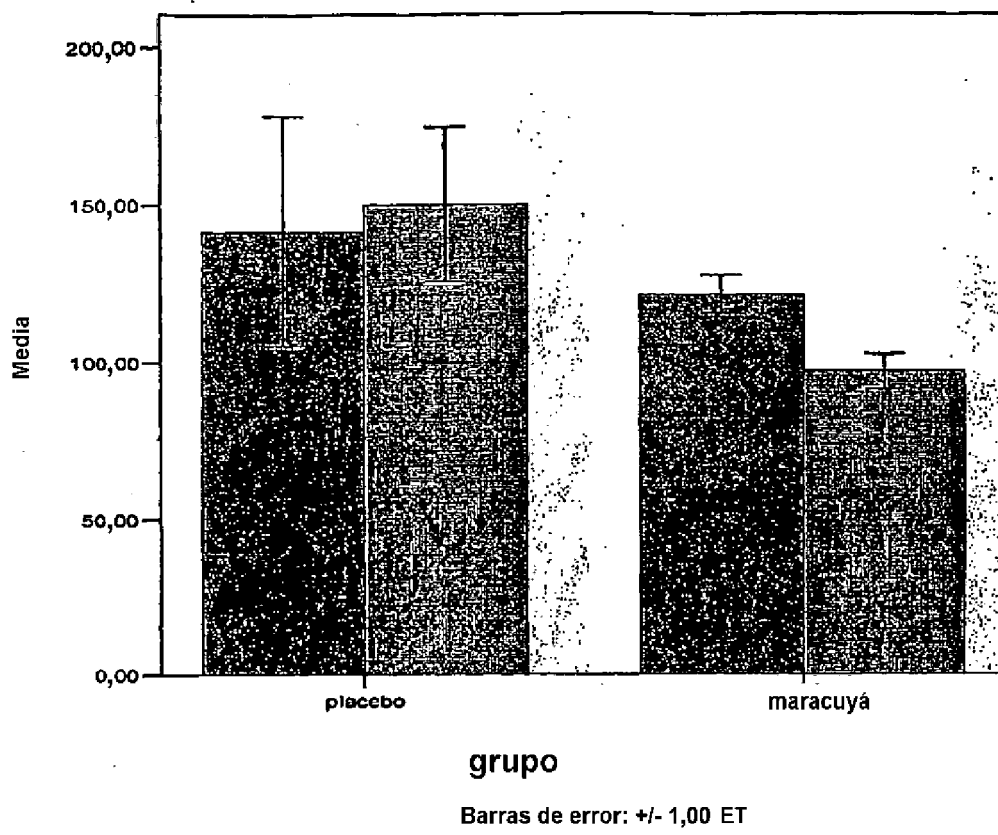


FIG. 17