



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 321 172**

(51) Int. Cl.:

A61K 36/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02785193 .0**

(96) Fecha de presentación : **10.10.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1438058**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.2004**

(54) Título: **Extracto acuoso de hojas y vainas de *Ceratonia siliqua* que contiene polifenoles con actividades anti-oxidante y antitumoral.**

(30) Prioridad: **17.10.2001 IT MI01A2141**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2009

(73) Titular/es: **Mario Baraldi**
Via Rosini, 80
41100 Modena, IT

(72) Inventor/es: **Baraldi, Mario**

(74) Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

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 acuoso de hojas y vainas de *Ceratonia siliqua* que contiene polifenoles con actividades antioxidante y antitumoral.

La presente invención se refiere a un extracto acuoso de hojas y vainas de *Ceratonia siliqua* que contiene polifenoles (ácido gálico, galato de (-)-epigallocatequina, galato de (-)-epicatequina) con actividad antioxidante y posible actividad antitumoral, útil para la preparación de composiciones farmacéuticas, complementos dietéticos o preparaciones extemporáneas para uso alimentario. Dicho extracto se caracteriza por un alto contenido en polifenoles así como por la ausencia de sustancias estimulantes del sistema nervioso central, tales como cafeína y teofilina.

Antecedentes de la técnica

Según numerosos artículos de la bibliografía, una dieta rica en frutas y verduras contribuye aparentemente a la prevención de tumores del tracto gastrointestinal [J.M. Pezzetto, Biochem. Pharmacol. 53:121-123, 1997]. De hecho, las verduras contienen varios compuestos con actividades antioxidante y antitumoral, entre otros flavonoides y polifenoles, que se considera que pueden interferir con el sistema microsómico hepático, evitando que active las sustancias cancerígenas que se encuentran en los alimentos y el entorno.

Los flavonoides son un grupo heterogéneo de polifenoles vegetales (más de 4000) que comparten una estructura de benzopirano. Constituyen pigmentos (colores naranja, rojo y azul) de diversos vegetales (flores, frutos, hojas) y son importantes factores para el crecimiento, desarrollo y protección de las plantas. Los principales flavonoides con actividad antioxidante presentes en vegetales son: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y los correspondientes ésteres del ácido gálico: galato de (-)-epicatequina y galato de (-)-epigallocatequina [Blot *et al.* Am. J. Cancer Prevention 62:1477-82, 1992].

Varios estudios notificaron la actividad antitumoral de estos compuestos [Cao Y. y Cao R. Nature 398: 391, 1999], en particular del galato de (-)-epigallocatequina (EGCG). EGCG toma parte en:

- la regulación del ciclo celular, en particular a través de la inhibición de la mitosis dependiente de la dosis bloqueando células en la fase G0-G1;
- la inducción de la apoptosis (muerte celular programada) en diversas células tumorales, pero no en las células normales. Este proceso es importante para mantener los equilibrios de proliferación y crecimiento celulares. De hecho, el crecimiento de células tumorales se debe a que escapan de los mecanismos de control normales, que también actúan a través de la regulación de la apoptosis;
- la inhibición de la urocinasa, una enzima proteolítica que permite que las células tumorales invadan las células adyacentes y formen metástasis;
- la inhibición de la angiogénesis;
- la eliminación de radicales libres gracias a su alto poder antioxidante.

Entre los productos vegetales comercialmente disponibles, los téis verdes y negros tienen actividades antioxidantes y antitumorales, debido a sus altos contenidos en flavonoides; sin embargo, no todos los individuos pueden tolerarlos debido a la presencia de sustancias estimulantes tales como cafeína y teofilina. Por tanto, serían valiosos productos vegetales que contengan flavonoides pero estén libres de cualquier sustancia estimulante, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades degenerativas y, en particular, de tumores [Fujiki H. *et al.* Nutrition Reviews 54: 67-70, 1996]. Cantalejo [Polyphenol Communications 98, 1998, págs. 27-28] describe la actividad antioxidativa y anticancerígena de los polifenoles condensados presentes en el extracto de vainas de algarrobo.

La presente invención se refiere a un extracto acuoso que tiene un alto contenido en polifenoles mientras que está libre de sustancias estimulantes, obtenido del algarrobo (un árbol de hoja perenne con follaje amplio, que pertenece al orden *Rosales*, familia *Papilionaceae*, subfamilia *Cesalpinoideae*, género *Ceratonia*, especie *Ceratonia siliqua*).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de un extracto seco o acuoso de hojas y vainas de *Ceratonia siliqua* (algarrobo), que contiene polifenoles, para la preparación de composiciones farmacéuticas, complementos dietéticos o preparaciones extemporáneas para uso alimentario, que tienen actividad antioxidante y posible actividad antitumoral. El término "polifenoles" en el presente documento significa preferiblemente ácido gálico, galato de (-)-epigallocatequina y galato de (-)-epicatequina.

La presente invención se refiere además al procedimiento para la preparación de dicho extracto.

Se infunden la harina u hojas y vainas de algarrobo en agua destilada caliente durante 15 min., preferiblemente en una razón de 1 g de hojas o harina con respecto a 50-200 ml de agua, lo más preferiblemente 1 g de hojas o harina

con respecto a 100 ml de agua. Entonces, se centrifuga el extracto acuoso y se filtra. Se obtiene opcionalmente un segundo extracto acuoso infundiendo adicionalmente el residuo de centrifugación. Se evaporan el extracto acuoso o los extractos acuosos combinados para obtener un extracto seco, que consiste únicamente en sustancias solubles en agua y que, por tanto, puede disolverse fácilmente y es muy adecuado para la preparación de formulaciones tales como sobres, jarabes, cápsulas. Este extracto está libre de sustancias estimulantes del sistema nervioso central: como consecuencia, se tolera bien y no requiere procedimientos de desteinación o descafeinización costosos.

Según una realización preferida de la invención, se prepara el extracto infundiendo 1 g de hojas o harina de vainas de algarrobo en 100 ml de agua destilada caliente durante 15 min. Entonces se centrifuga el extracto acuoso a 13.000 rpm durante 10 min. y se filtra a través de filtros de PTFE de 0,22 μm . Se obtiene un segundo extracto repitiendo el procedimiento con el residuo de centrifugación.

Las hojas y vainas de algarrobo contienen bastante cantidad de polifenoles, principalmente catequinas (ácido gálico, galato de (-)-epicatequina, galato de (-)-epigallocatequina), que se han separado y purificado mediante cromatografía (HPLC). Las cantidades obtenidas son (tabla nº 1, ejemplo 2) de 6,28 mg/g de hojas secas para las hojas y de 1,36 mg/g de harina para la harina de vainas, respectivamente.

Las pruebas biológicas llevadas a cabo usando las catequinas mencionadas anteriormente manifestaron una marcada reducción dependiente de la dosis en la proliferación de cultivos de células tumorales hepáticas. La figura 1 muestra las actividades dependientes de la dosis de EGCG (a) y EGC (b) sobre la inhibición de la proliferación celular en células tumorales de hígado tras una exposición de 24 horas (puntos blancos) y 48 horas (puntos negros). El galato de (-)-epigallocatequina (EGCG) y el galato de (-)-epicatequina (ECG) inhiben la proliferación ya a concentraciones de 40 $\mu\text{g/ml}$, alcanzando la actividad máxima a concentraciones de 80 $\mu\text{g/ml}$. Además, dicha reducción resultó ser superior para los tratamientos de 48 horas en comparación con los tratamientos de 24 horas.

Además, las catequinas a concentraciones de 80 $\mu\text{g/ml}$ inducen apoptosis provocando un aumento significativo en la actividad proteasa de la caspasa 3 en comparación con células no tratadas. La figura 2 muestra la activación de la actividad proteasa ejercida por ECG y EGCG solos y en combinación con un inhibidor específico de la caspasa 3 (Z-VAD-FMK) expresada como unidades arbitrarias referidas a la densidad óptica de la instrumentación usada.

La invención se ilustra con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de patrones y muestras

Se prepararon patrones que consistían en una mezcla de (+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC), 3-galato de (-)-epigallocatequina (EGCG), 3-galato de (-)-epicatequina (ECG), ácido gálico (GAc), teofilina (T), cafeína (Ca), ácido clorogénico (ClAc), ácido cafeico (Cac), catecol (Ct) y extractos de té, que contienen teaflavina, 3-monogalato de teaflavina, 3'-monogalato de teaflavina y 3,3'-digalato de teaflavina (con una pureza >8 0%), disolviendo cantidades conocidas de todos los analitos en la fase móvil usada para la separación cromatográfica de modo que se alcanzan concentraciones de desde 0,3 hasta 500 $\mu\text{g/ml}$. Se prepararon muestras infundiendo 1 g de hojas o harina de vainas de algarrobo en 100 ml de agua destilada caliente durante 15 min. Después, se centrifugó el extracto acuoso a 13.000 rpm durante 10 min., luego se filtró a través de filtros de PTFE de 0,22 μm . Se obtuvo un segundo extracto acuoso a partir del residuo de centrifugación.

Ejemplo 2

Análisis cromatográfico

Se llevó a cabo la separación cromatográfica con una columna analítica Microsorb RP-C₁₈ 100 A (250 X 4,6 mm), termostatzada a 40°C, usando un gradiente con una composición de partida: 68% de agua, 22% de ácido fosfórico al 0,5%, 4% de acetonitrilo y 6% de metanol, aumentando linealmente los disolventes orgánicos con un flujo de 1 ml/min. Se registraron de manera continua los espectros de absorción UV-Vis ($\lambda = 198\text{-}708\text{ nm}$) y se identificaron los picos de absorción de las muestras comparando los tiempos de retención y los espectros UV-Vis con los del patrón. Se usó el área de pico a 205 nm para establecer curvas de calibración.

TABLA 1

Cuantificación de catequinas mediante análisis cromatográfico

	HOJAS DE ALGARROBO			HARINA DE ALGARROBO		
	mg/g $\pm$ DE*			mg/g $\pm$ DE*		
	1ª infusión	2ª infusión	Total	1ª infusión	2ª infusión	Total
GAc	3,34 $\pm$ 0,032	0,96 $\pm$ 0,020	4,30	0,87 $\pm$ 0,000	0,33 $\pm$ 0,007	1,20
EGC	-	-	-	0,05 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,001	0,06
C	-	-	-	0,01 $\pm$ 0,000	-	0,01
EGCG	1,23 $\pm$ 0,409	0,28 $\pm$ 0,030	1,51	0,01 $\pm$ 0,000	-	0,01
EC	-	-	-	-	-	-
ECG	0,47 $\pm$ 0,095	-	0,47	0,06 $\pm$ 0,000	0,02 $\pm$ 0,004	0,08
Total	5,04 $\pm$ 0,395	1,24 $\pm$ 0,049	6,28	1,00 $\pm$ 0,008	0,36 $\pm$ 0,002	1,36

* = Medias y desviaciones estándar para 3 determinaciones

Ejemplo 3

Experimentación farmacológica

Cultivos celulares

Los cultivos de células tumorales (T1) usados en las pruebas derivan de carcinoma hepatocelular de ratones transgénicos, en los que se había inducido una sobreexpresión del *c-myc* y *TGF α* . Se mantuvieron las células en medio DMEM libre de L-glutamina, HAM F 12 que contenía galactosa 1 mg/ml, HEPES 18 mM, piruvato de Na 5 mM, prolina 30 mg/ml, ITS 100 X, glutamina 2 mM, 0,1% de gentamicina (Sigma-Aldrich, Italia) y se añadió un 10% de FBS. Se cultivaron las líneas celulares en placas de poliestireno (Dasit, Italia).

Ensayo de proliferación celular

Se sembraron en placa células T1 en placas de 96 pocillos a una concentración de 10.000 células/pocillo y se dejaron sedimentar durante 4-5 horas. Entonces se incubaron las células en EGCG o ECG a una concentración de 20, 40, 60, 80, 160 μ g/ml durante 24 y 48 horas. Se diluyeron las sustancias con el medio de cultivo partiendo de disoluciones madre (disolución acuosa para EGCG y disolución acuosa-etanólica (1:1) para ECG). Se trataron las células control con disoluciones que contenían etanol en cantidades correspondientes a las de las muestras que contenían catequinas. Tras 24 ó 48 horas, se midió colorimétricamente la proliferación usando un kit específico (ensayo de proliferación celular Cell Titer Aqueous, Promega) que hace uso de una reacción de transformación colorimétrica de MTS (sal de tetrazolio) incoloro en formazán coloreado por células vivas, en proliferación. Se llevó a cabo la cuantificación del formazán mediante análisis espectrofotométrico a $\lambda = 490$ nm.

Evaluación de la activación de la caspasa 3

Se determinó la actividad proteasa de la caspasa 3 en lisados celulares usando un kit de Promega. Se trataron las células T1 con EGCG y ECG (80 μ g/ml) solos o en combinación con un inhibidor de la caspasa (Z-VAD-FMK) durante 24 ó 48 horas. Después, se añadió un sustrato colorimétrico (DEVD-pNA) que puede manifestar actividad proteasa. Tras incubación durante 4 horas a 37°C, se determinó la actividad proteasa mediante análisis espectrofotométrico a $\lambda = 405$ nm.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un extracto acuoso de hojas y vainas de *Ceratonia siliqua* que contiene flavonoides para la preparación de medicamentos, complementos dietéticos o productos alimenticios con actividades antioxidante y antitumoral.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que el extracto de *Ceratonia siliqua* es un extracto seco.

10 3. Uso de un extracto según las reivindicaciones 1-2, en el que los flavonoides son ácido gálico, galato de (-)-epigallocatequina, galato de (-)-epicatequina.

4. Procedimiento para la preparación de extractos de hojas y vainas de *Ceratonia siliqua* que contienen flavonoides, que comprende las siguientes etapas:

15 a) infundir las hojas o la harina de vainas en agua destilada caliente;

b) centrifugar el extracto acuoso;

c) filtrar el extracto acuoso;

20 d) eliminar por evaporación el agua;

e) repetir opcionalmente las etapas a)-d) con el residuo de centrifugación de la etapa b).

25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que se usan de 50 a 200 ml de agua por 1 g de hojas o harina de vainas.

6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que se usan 100 ml de agua por 1 g de hojas o harina de vainas.

30 7. Extractos que pueden obtenerse mediante el procedimiento según las reivindicaciones 4-6.

8. Preparaciones farmacéuticas, complementos dietéticos o productos alimenticios que contienen el extracto según la reivindicación 7.

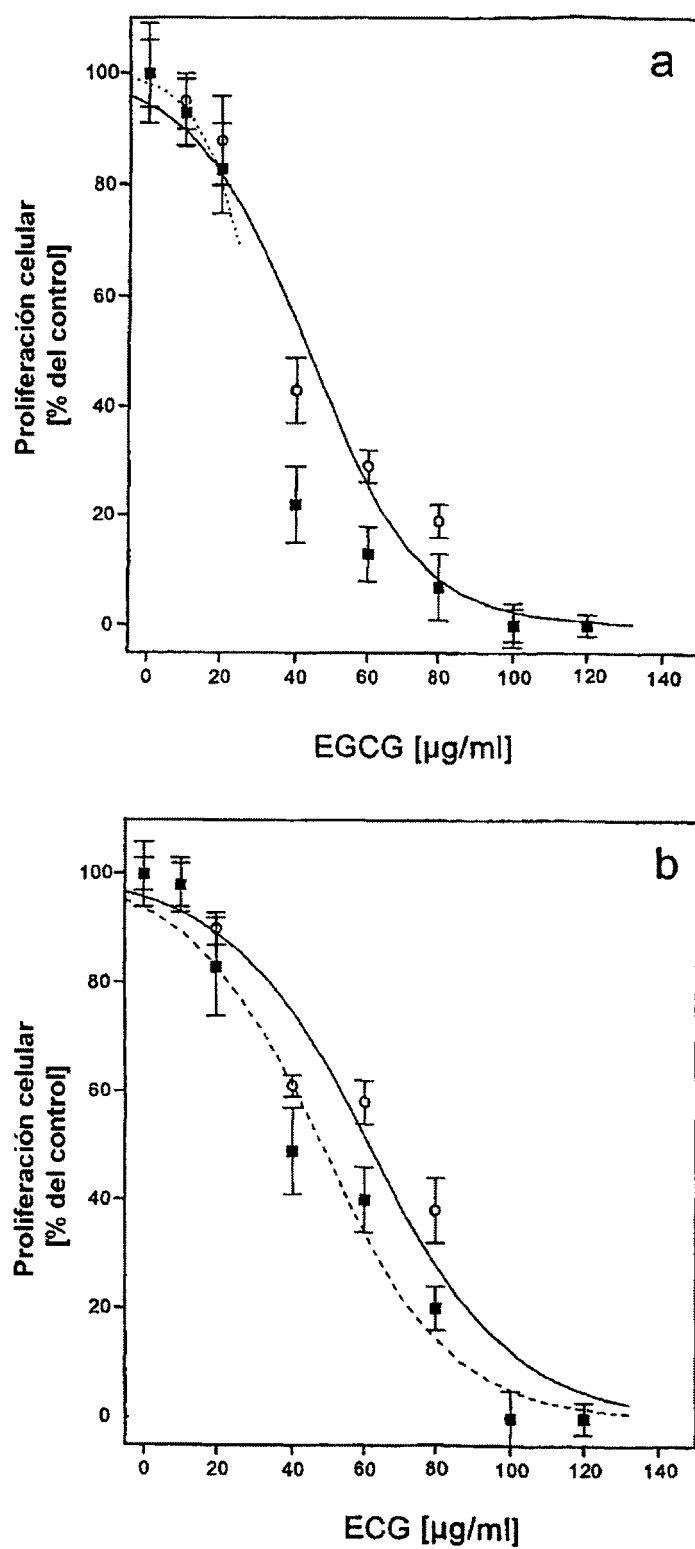


Figura 1

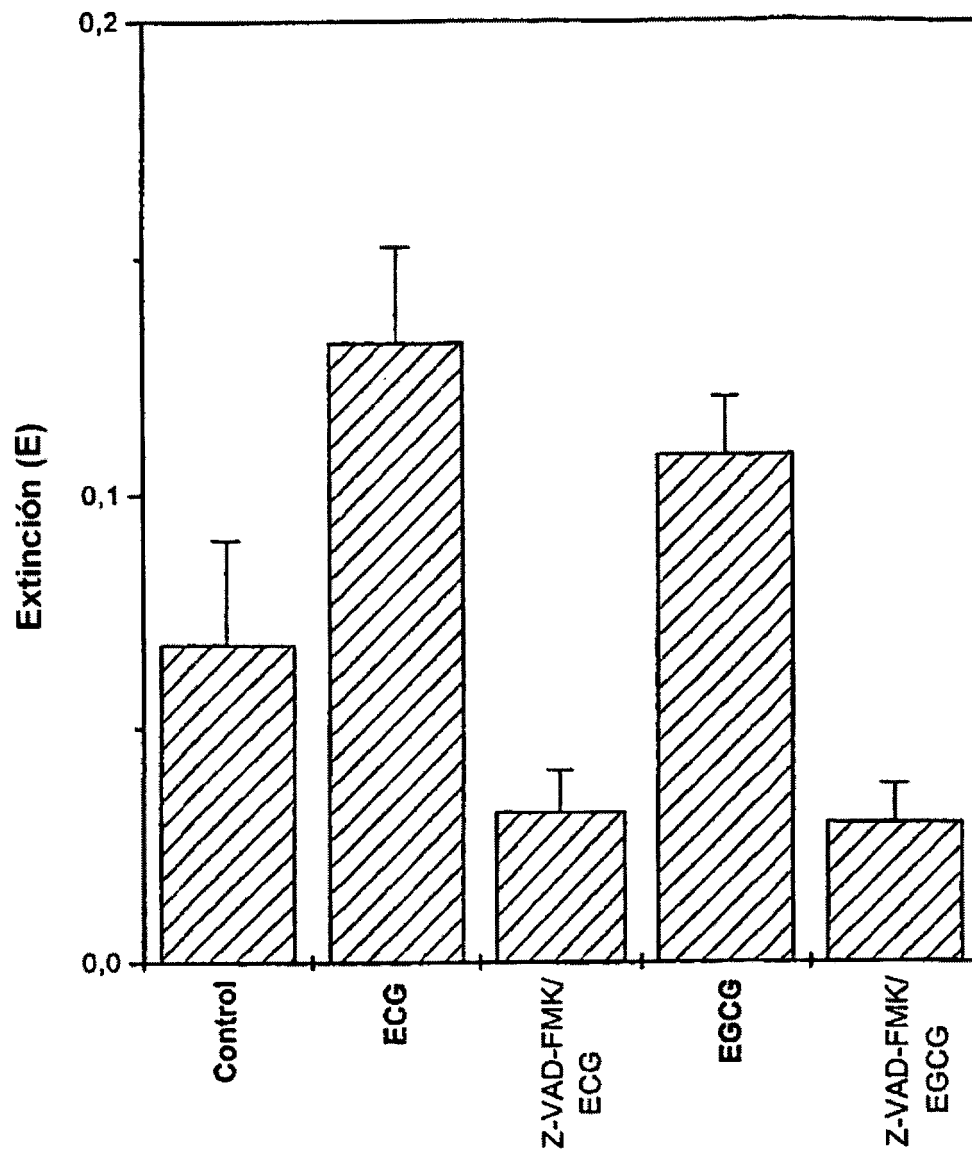


Figura 2