



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 051**

51 Int. Cl.:  
**A61K 36/28** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05821668 .0**  
96 Fecha de presentación : **23.12.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1843759**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2007**

54 Título: **Extractos terapéuticos obtenidos a partir de *Calomeria amaranthoides* y sus usos.**

30 Prioridad: **23.12.2004 AU 2004907275**  
**28.01.2005 AU 2005900353**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.07.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.07.2009**

73 Titular/es: **Caroline van Haften**  
**21 Charles Street Forest Lodge**  
**Sydney, New South Wales 2037, AU**

72 Inventor/es: **Van Haften, Caroline**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 324 051 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Extractos terapéuticos obtenidos a partir de *Calomeria amaranthoides* y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere de una forma amplia a extractos de plantas *Calomeria amaranthoides*, que muestran actividad citotóxica contra una diversidad de tipos de células que acusan división celular hiperproliferativa.

10 **Antecedentes de la invención**

La *Calomeria amaranthoides*, que es conocida más comúnmente como *Incense Plant* (planta del incienso) o *Plum Bush* (arbusto de ciruelas), pertenece a la familia Asterácea de margaritas. Su aspecto es en cierto modo similar al de una planta de tabaco, teniendo hojas arrugadas de color verde lima desde las cuales se emite un olor aromático, y son pegajosas al tacto. La planta es bianual, y florece en una gama de colores desde un rosa blanquecino, una gama de tonos rosáceos, y el color que se presenta con mayor frecuencia, el rojo. Los capítulos o cabezuelas tienen un aspecto plumoso y están muy valoradas en la industria de la floristería.

La *Calomeria amaranthoides* es una planta de origen australiano y crece a lo largo de riveras y regiones costeras de Nueva Gales del Sur y Victoria. Las hojas de las plantas forman parte de la dieta de animales australianos nativos que viven en esas zonas, y es evidente la escasa o nula toxicidad presente en los animales que dependen de estas plantas como fuente de alimento. Esta información, junto con la manipulación de las flores de *Calomeria amaranthoides* por las personas durante la recolección y la realización de arreglos florales, proporciona una expectativa de baja toxicidad para los mamíferos en el uso de extractos de *Calomeria amaranthoides* como fármaco.

Spiridonov *et al.*, en *Phytother. Res.* 19: 428-32 (2005) describen que extractos de algunas plantas etnomedicinales rusas entre las que se incluyen *Chelidonium majus*, *Potentilla erecta*, *Chamaenerium ausgustifolium*, *Filipendula ulmaria* e *Inula helenium*, tienen efectos citotóxicos.

El documento KR2004107185 describe el uso de extractos de la especie vegetal *Inula helenium* L. para el tratamiento del cáncer.

Dirsch *et al.*, en *Planta Med.* 67: 557-9 (2001) describen el efecto citotóxico de compuestos individuales extraídos de las especies vegetales *Psilostrophe cooperi* y *Hymenoclea salsola*.

Konishi *et al.*, en *Biol. Pharm. Bull.* 25 (10): 1370-72 (2002) describe la actividad antiproliferativa de extractos de raíces de *Inula helenium* y compuestos aislados de las mismas.

El presente inventor ha determinado ahora que extractos de *Calomeria amaranthoides* muestran unas potentes y selectivas propiedades citotóxicas hacia determinados tipos de células que muestran una división celular hiperproliferativa y, en particular, contra tipos de células cancerosas, pero no contra una diversidad de células normales.

**Sumario de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un extracto de *Calomeria amaranthoides* que muestra actividad citotóxica hacia células que muestran condiciones asociadas con una división celular hiperproliferativa.

Preferentemente, el extracto se deriva de las hojas de *Calomeria amaranthoides*.

En una realización, el extracto es un extracto derivado de un disolvente orgánico. Preferentemente el disolvente orgánico se elige entre el grupo consistente en cloroformo, éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y metanol. Lo más preferentemente, el disolvente es cloroformo.

En una realización preferida, el extracto muestra un espectro de NMR de protón como el que se presenta en la Figura 5A y un espectro de  $C^{13}$ NMR como se muestra en la Figura 5B.

En otra realización, el extracto es un extracto no polar.

En una realización, la actividad citotóxica de los extractos resulta de una interacción sinérgica entre dos o más compuestos dentro del extracto.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un extracto de acuerdo con la invención, y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona el uso de un extracto de *Calomeria amaranthoides* de acuerdo con la invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una condición en un paciente, asociada con la división celular hiperproliferativa.

Preferentemente, la condición asociada con la división celular hiperproliferativa es un cáncer sólido o un cáncer maligno hematopoiético. Más preferentemente, la condición es cáncer de ovario.

De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona un preparado farmacéutico que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un extracto de *Calomeria amaranthoides*, y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

En una forma particularmente preferida, al menos uno de los extractos contiene al menos un compuesto elegido entre el grupo que comprende estructuras del tipo de las eudesmanolidas, en particular lactonas de sesquiterpenos, poliacetilenos, alcaloides, cumarinas, cumarinas preniladas, flavonoides, p-hidroxiacetofenona, acetofenona, diterpenos, lignanos (en particular lignanos difuranoides) e inhibidores de topoisomerasa de DNA, y/o derivados o análogos de los compuestos antes mencionados.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un examen de espectrometría de masas de un extracto crudo en cloroformo de *Calomeria amaranthoides*.

Las Figuras 2A a 2J muestran un examen de HPLC de la fracción 2 (recogida de la columna de cromatografía del extracto de *Calomeria amaranthoides*), analizada en columnas de HPLC de fase directa Silica 5Si60 y detectada a diferentes longitudes de onda.

La Figura 2K muestra un examen de HPLC de un extracto crudo en cloroformo de *Calomeria amaranthoides*, analizado en una columna LC-18-DB (fase inversa).

Las Figuras 3A a 3C son representaciones gráficas del porcentaje de actividad de células cancerosas de ovario, fibroblastos de la piel humana y linfocitos humanos, tratados con un extracto crudo en cloroformo de *Calomeria amaranthoides* a diversas concentraciones.

Las Figuras 4A muestran microfotografías de fibroblastos de la piel humanos (Fib.) tratados con 1, 10 ó 100 µg/ml de extracto de *Calomeria amaranthoides*, Cisplatino o Docetaxol. Las microfotografías se tomaron a las 48 horas.

Las Figuras 4B muestran microfotografías de células cancerosas de ovario JC tratadas con 1, 10 o 100 µg/ml de extracto de *Calomeria amaranthoides*, Cisplatino o Docetaxol. Las microfotografías se tomaron a las 48 horas después del tratamiento.

La Figura 5A muestra un espectro de <sup>1</sup>H NMR de la fracción 12 (recogida de la cromatografía en columna del extracto de *Calomeria amaranthoides*).

La Figura 5B muestra un espectro de <sup>13</sup>C NMR de la fracción 12 (recogida de la cromatografía en columna del extracto de *Calomeria amaranthoides*).

La Figura 6 muestra placas de TLC (cromatografía en capa fina) para 57 extractos de *Calomeria amaranthoides*.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que las palabras o expresiones “comprender”, “comprende” y “que comprende” implican la inclusión de una etapa establecida, o elemento, o grupo de etapas o de elementos, pero no la exclusión de ninguna otra etapa, o elemento, o grupo de etapas o de elementos.

La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria no es, y no debe considerarse como tal, un reconocimiento ni ninguna otra forma de sugerencia de que la técnica anterior forma parte del conocimiento general común en Australia.

En su forma más amplia, la presente invención se refiere a extractos de una o más partes de una planta de *Calomeria amaranthoides*. Los profesionales expertos en la técnica apreciarán que hay varios métodos distintos para sintetizar extractos de material vegetal crudo, que empiezan por cortar o triturar el material vegetal crudo y exponerlo a al menos un disolvente, con el fin de obtener un extracto vegetal. Alternativamente, por ejemplo, el material vegetal crudo puede en primer lugar ser molido formando un polvo fino, y ser sometido a un proceso de extracción en soxhlet.

En el presente texto se describen compuestos aislados de extracto o plantas de *Calomeria amaranthoides*, y derivados o análogos de los mismos.

Un profesional experto en la técnica apreciará que hay varios métodos que pueden usarse para aislar y caracterizar compuestos contenidos en extractos vegetales. Las muestras de tales métodos incluyen, pero sin limitarse a los mismos, fraccionar los extractos mediante cromatografía, con adsorbentes apropiados, y purificar los extractos usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento y cromatografía centrífuga en contracorriente.

Además, la caracterización de constituyentes puros conocidos o nuevos puede realizarse usando métodos tales como espectrometría y espectroscopía de masas, incluyendo espectroscopía de ultravioleta, de infrarrojo, de rayos X y de resonancia magnética nuclear (NMR) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Una vez dilucidados, los constituyentes pueden ser preparados mediante un procedimiento de síntesis.

En otra forma, los extractos de *Calomeria amaranthoides* muestran actividad citotóxica hacia células que acusan condiciones asociadas con la división celular hiperproliferativa.

La expresión “condición asociada con la división celular hiperproliferativa”, que se usa en el presente texto, se refiere a cualquier condición clínica caracterizada, o que interviene de alguna otra forma, por una mayor tasa de división celular, en relación a una tasa de referencia normal. Las condiciones asociadas con la división celular hiperproliferativa incluyen, pero sin limitarse a ellas, síndromes mieloproliferativos tales como histiocitosis de células de Langerhans, mastocitosis, condiciones mieloproliferativas y mielodisplásicas mixtas; condiciones cutáneas proliferativas tales como soriasis, eritroderma ictiosiforme congénita no vesicular. Las condiciones asociadas con la división celular hiperproliferativa incluyen cáncer, sea benigno o maligno, incluyendo cánceres malignos hematopoiéticos.

En una forma preferida, la condición asociada con la división celular hiperproliferativa es cáncer.

También se describen en el presente texto derivados y análogos de compuestos de extractos de *Calomeria amaranthoides* que manifiestan actividad citotóxica hacia células que muestran condiciones asociadas con división celular hiperproliferativa.

Los compuestos descritos en el presente texto incluyen todas las sales, tales como las sales de adición de ácido, sales aniónicas y sales zwitteriónicas, y en particular incluyen sales aceptables farmacéuticamente como las conocidas por los expertos en la técnica. La expresión “sal aceptable farmacéuticamente” se refiere a un resto orgánico o inorgánico que lleva una carga y que puede ser administrado en asociación con un agente farmacéutico, por ejemplo, como catión contrario o anión contrario en una sal. Los cationes aceptables farmacéuticamente son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a ellos, sodio, potasio, calcio, zinc y amina cuaternaria. Los aniones aceptables farmacéuticamente son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a ellos, cloruro, acetato, tosilato, citrato, bicarbonato y carbonato.

Las sales aceptables farmacéuticamente incluyen las formadas por los ácidos acético, ascórbico, aspártico, benzoico, benenosulfónico, cítrico, cinámico, etanosulfónico, fumárico, glutámico, glutárico, glucónico, clorhídrico, bromhídrico, láctico, maleico, málico, metanosulfónico, naftoico, hidroxinaftoico, naftalenosulfónico, naftaleno-disulfónico, naftalenoacrilico, oleico, oxálico, oxalacético, fosfórico, pirúvico, p-toluenosulfónico, tartárico, trifluoroacético, trifenilacético, tricarbálico, salicílico, sulfúrico, sulfámico, sulfanílico y succínico.

El término “derivado” se refiere a un derivado del compuesto activo que, al administrarlo al receptor, es capaz de proporcionar directa o indirectamente el compuesto progenitor o metabolito, o que muestra actividad él mismo, e incluye por ejemplo derivados fosfato y derivados sulfonato. Así pues, los derivados incluyen solvatos, ésteres farmacéuticamente activos, profármacos o similares. Esto incluye también derivados con grupos lábiles segmentables fisiológicamente, que pueden escindir-se *in vivo* para proporcionar los compuestos de la presente invención o su resto activo. Los grupos lábiles pueden incluir los grupos acilo, fosfato, sulfato, sulfonato, y preferentemente son compuestos mono-, di- y per-aciloxi-sustituidos, en los que uno o más de los grupos hidroxilo colgantes están protegidos por un grupo acilo, preferentemente un grupo acetilo. Típicamente los compuestos aciloxi sustituidos de la presente invención son fácilmente segmentables para dar los correspondientes compuestos sustituidos con hidroxilo.

También se describe en el presente texto un método de tratamiento o de profilaxis de una condición en un paciente, asociada con la división celular hiperproliferativa, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un extracto y/o uno o más compuestos aislados del extracto o derivado o análogo de uno o más compuestos.

Por “cantidad efectiva”, en el contexto del tratamiento o la prevención de una condición, se entiende la administración a un individuo en necesidad de tal tratamiento o profilaxis, bien sea en una dosis individual o como parte de una serie, de una cantidad de principio activo que es eficaz para el tratamiento de esa condición o la profilaxis contra la misma. La cantidad efectiva variará dependiendo de la salud y el estado físico del individuo al que hay que tratar, el grupo taxonómico del individuo al que hay que tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la situación médica, y otros factores de interés. Se espera que la cantidad entrará dentro de un margen relativamente amplio, que puede determinarse por medio de ensayos de rutina.

El término “paciente” se refiere a pacientes humanos u otros mamíferos, e incluye cualquier individuo al que se desee examinar o tratar usando los métodos de la invención. Sin embargo, se entenderá que el término “paciente” no implica que haya síntomas presentes. Los mamíferos adecuados que entran dentro del alcance de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, primates, ganado (p. ej. ovejas, vacas, caballos, asnos, cerdos), animales para ensayos de laboratorio (p. ej. conejos, ratones, ratas, cobayas, hamsters), animales de compañía (p. ej. gatos, perros) y animales salvajes cautivos (p. ej. zorros, ciervos, dingos).

Puede emplearse cualquier vía de administración adecuada para proporcionar a un paciente los preparados farmacéuticos y medicamentos de la presente invención. Por ejemplo, pueden emplearse las vías oral, rectal, parenteral,

## ES 2 324 051 T3

sublingual, bucal, intravenosa, intraarticular, intramuscular, intradérmica, subcutánea, inhalatoria, intraocular, intrape-  
ritoneal, intracerebroventricular, transdérmica y vías similares.

5 En otra realización, la presente invención se refiere al uso de un extracto de *Calomeria amaranthoides* en la  
preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una condición en un paciente, asociada con la  
división celular hiperproliferativa.

10 En otra realización más, la invención se refiere a preparados farmacéuticos que comprenden una cantidad farma-  
céuticamente efectiva de un extracto de *Calomeria amaranthoides*, y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

15 Por “vehículo aceptable farmacéuticamente” se entiende se entiende una carga sólida o líquida, un diluyente o  
una sustancia encapsulante, que pueden usarse con seguridad para la administración del medicamento o el preparado  
farmacéutico a un paciente. Dependiendo de la vía de administración en particular, pueden usarse diversos vehículos  
aceptables farmacéuticamente, bien conocidos en la técnica. Estos vehículos pueden elegirse entre un grupo que in-  
cluye azúcares, almidones, celulosa y sus derivados, malta, gelatina, talco, sulfato cálcico, aceites vegetales, aceites  
sintéticos, polioles, ácido algínico, soluciones tamponadas con fosfato, emulsionantes, solución salina isotónica, y  
agua exenta de agentes pirógenos.

20 Los preparados farmacéuticos y medicamentos de la presente invención, adecuados para administración oral o  
parenteral, pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sobres o comprimidos, cada uno de los  
cuales contiene una cantidad de extracto predeterminada, o uno o más compuestos aislados de un extracto y/o derivados  
o análogos de los mismos, en forma de polvos o gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso,  
un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Tales preparados y  
25 medicamentos pueden obtenerse por cualquiera de los métodos de la industria farmacéutica, pero todos los métodos  
incluyen la etapa de poner en contacto el extracto que se describió anteriormente con el vehículo que constituye uno o  
más ingredientes necesarios. En general, los preparados farmacéuticos y medicamentos se obtienen mezclando de una  
manera uniforme e íntima el extracto con los vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y  
después, si es necesario, conformar el producto en la forma de presentación deseada.

30 Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede ser administrada a un paciente, antes  
de un estado sintomático asociado a la condición, o después de la aparición de los síntomas de la condición. El agente  
o los agentes terapéuticos presentes en los preparados y medicamentos se proporcionan durante un tiempo y en una  
cantidad suficientes para tratar al paciente.

35 Como ya se ha indicado antes, los extractos y compuestos descritos en el presente texto pueden usarse en la  
preparación de medicamentos y preparados farmacéuticos, para su uso en el tratamiento de tumores.

40 En particular, los presentes extractos de *Calomeria amaranthoides*, medicamentos y composiciones farmacéuticas  
que contienen extractos de *Calomeria amaranthoides* son particularmente efectivos contra una diversidad de tumores  
entre los que se incluyen, por ejemplo, tumores sólidos tales como los tumores gastrointestinales, por ejemplo el cáncer  
colorrectal, cáncer gastroesofágico, cáncer de hígado y del tracto biliar y cáncer de páncreas, cáncer de próstata; cáncer  
de testículo; cáncer de pulmón; cáncer de mama; melanoma maligno; cáncer de ovarios; cáncer de útero, incluyendo  
cáncer cervical; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de vejiga; sarcomas y osteosarcoma; sarcoma de Kaposi, incluyendo  
45 sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; carcinoma renal; tumores malignos hematopoiéticos tales como leucemia  
y linfoma, incluyendo linfomas relacionados con el SIDA.

50 Además, los extractos de la presente invención de los preparados farmacéuticos o medicamentos hechos a partir  
de los mismos, pueden ser administrados de acuerdo con el programa de tratamiento indicado anteriormente, opcio-  
nalmente con otros agentes antitumorales, como preparado combinado para uso simultáneo, separado o secuencial, en  
una terapia anticancerosa.

55 Los agentes antitumorales adicional anteriores incluyen, por ejemplo, agentes de alquilación, inhibidores de la  
topoisomerasa I y II, agentes antimicrotúbulos y antimetabolitos. Como ejemplo, agentes antitumorales específicos son  
mostazas tales como melfalán, clorambucil, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida y busulfán; nitrosoureas tales  
como carmustina, lormustina, semustina y fotemustina; tetrazinas tales como dacarbazina y temozolamida; aziridinas  
tales como tiotepa y mitomicina C; derivados de platino tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino  
y lobaplatino; derivados de campotecina tales como CTP-11, topotecán, 9-amino-campotecina, 9-nitro-campotecina  
y 10,11-metilendioxi-campotecina; derivados de antraciclina tales como doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina,  
nemorrubicina e idarrubicina; compuestos de podofilotoxina etoposida y teniposida; derivado de antraquinona del tipo  
60 de mitoxantrona y lodoxantrona; derivados de acridina del tipo de amsacrina y actinomaycina D; taxanos tales como  
paclitaxel o docetaxel; alcaloides de vinca tales como vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina; estramustina;  
antifolatos tales como metotrexato, trimetrexato, tomudex; 5-fluoropirimidinas tales como 5-FU, fluxoridina, ftorafur  
y capecitabina; análogos de citidina tales como citarabina, azacitidina y gemcitabina.

65 Las formas de dosificación incluyen comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, soluciones, jarabes,  
tabletas, cápsulas, supositorios, aerosoles, parches transcutáneos, y similares. Estas formas de dosificación pueden  
incluir también inyectar o implantar dispositivos de liberación controlada diseñados específicamente para este fin, u  
otras formas de implantes modificados para que actúen adicionalmente de esta manera. La liberación controlada del

agente terapéutico puede efectuarse recubriéndolo, por ejemplo, con polímeros hidrófobos entre los que se incluyen resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos polilácticos y poliglicólicos y ciertos derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa. Además, la liberación controlada puede efectuarse usando otras matrices de polímero, liposomas y/o microesferas.

5 Los anteriores medicamentos o preparados farmacéuticos pueden ser administrados de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en cantidades tales que sean eficaces terapéuticamente para aliviar a los pacientes de síntomas relacionados con la condición asociada con la división celular hiperproliferativa, o en cantidades suficientes para proteger a los pacientes del desarrollo de síntomas relacionados con la condición. La dosis administrada a un  
10 paciente, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para obtener una respuesta beneficiosa en un paciente a lo largo del tiempo, tal como los efectos terapéuticos o profilácticos mencionados anteriormente. La cantidad de agente o agentes terapéuticos a administrar puede depender del sujeto al que se ha de tratar, en aspectos entre los que se incluyen su edad, sexo, peso y estado general de salud. En este aspecto, las cantidades exactas de agente o  
15 agentes terapéuticos para su administración dependerá del criterio del médico. Al determinar la cantidad efectiva de agente terapéutico a administrar en el tratamiento o la profilaxis de la condición concreta, el médico puede evaluar el progreso de la condición. En todo caso, las dosis adecuadas de los agentes terapéuticos de la invención pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la técnica. Tales dosificaciones pueden oscilar entre cantidades del orden de microgramos y gramos, de los agentes terapéuticos de la invención.

20 Para que la invención sea fácilmente entendida y puesta en práctica, se describirán ahora realizaciones preferidas concretas por medio de los ejemplos que siguen.

#### Ejemplo 1

25 *Extracción con disolvente de plantas de Calomeria amaranthoides de uno y de dos años de edad*

Se usaron varios disolventes para extraer los componentes activos de plantas de un año de edad y de dos años de edad.

30 Las hojas de las plantas se secaron para dar 10 gramos de material de partida, y el material orgánico que contenían se extrajo usando diversos disolventes tales como cloroformo y metanol, aunque entre otros disolventes adecuados se incluyen éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo o agua.

35 En forma resumida, se recogieron 350 gramos de hojas de Calomeria amaranthoides de plantas de 1 año o de 2 años de edad. Las hojas se secaron sin luz solar a temperatura ambiente, y después se cortaron en trozos pequeños.

40 El material de hojas secas se empapó en cloroformo y, al cabo de 24 a 48 horas, se obtuvo el extracto crudo de las hojas. Este extracto crudo se adsorbió después en gel de sílice (60H, 5-40  $\mu\text{m}$ ; Merck) usando cromatografía en columna bajo gravedad. Se obtuvieron 13 fracciones de las hojas de las plantas de Calomeria de un año de edad. En un procedimiento de purificación repetida se obtuvieron 57 fracciones de las mismas plantas de Calomeria a los 2 años de edad.

45 También se obtuvo un extracto crudo usando metanol para comparación con la extracción con cloroformo.

#### Ejemplo 2

50 *Espectrometría de masas del extracto crudo de Calomeria amaranthoides*

El extracto crudo en cloroformo obtenido de acuerdo con el Ejemplo 2 fue analizado usando espectrometría de masas. Los resultados de este procedimiento se muestran en la Figura 1.

55 La espectrometría de masas de ionización química se realizó con un espectrómetro de masas cuadrupolar triple (TSQMS: Triple Stage Quadropole Mass Spectrometry) ThermoFinnigan, para medir el rango de masas. El aparato tenía una electropulverización positiva.

#### Ejemplo 3

60 *Cromatografía en capa fina de un extracto crudo de Calomeria amaranthoides en cloroformo*

Las placas analíticas de cromatografía en capa fina utilizadas fueron gel de sílice 60F 254, sobre láminas con soporte de aluminio (0,2 mm) de Merck, Darmstadt. El gel de sílice 60H (5-40  $\mu\text{m}$ ) (Merck) se usó para la cromatografía  
65 en columna. Se muestrearon cincuenta y siete fracciones del extracto crudo en cloroformo de las hojas de Calomeria amaranthoides usando cromatografía en columna bajo gravedad. Una muestra analítica de cada fracción se aplicó como mancha en el fondo de la placa de TLC. Las placas de TLC se desarrollaron en cloroformo o en una mezcla de cloroformo y metanol. Los compuestos se visualizaron bajo luz UV a 254 nm y se calculó el  $R_f$ .

## ES 2 324 051 T3

Los resultados se muestran en la Figura 6A.

### Ejemplo 4

#### Citotoxicidad de los extractos de *Calomeria amarantoides*

##### Ensayo de inhibición del crecimiento de células

Cultivos celulares de L<sub>1210</sub>, líneas de células cancerosas de ovario, una línea de células de colon. Células de ovario y mama normales, fibroblastos de piel humanos y linfocitos humanos

Una línea de células de leucemia de ratón (L<sub>1210</sub>), cinco líneas de células de cáncer de ovario: JV, JC, JG (van Haaften-Day *et al.*, Cancer Research 43: 3725-3731, 1983), JoN y NF (van Haaften-Day *et al.*, Cancer Research 65: 1753-1761, 1990), una línea de células cancerosas de colon T/O, células epiteliales normales de tejido de ovario y mama (van Haaften-Day *et al.*, Int. J. Gynecol. Cancer 2: 41-48, 1992), fibroblastos de la piel humanos y linfocitos humanos fueron ensayados en relación con la inhibición del crecimiento y la citotoxicidad con extractos de *Calomeria amarantoides*.

Se sembraron 10<sup>4</sup> o 5.10<sup>4</sup> células/ml en placas de 24 pocillos (Costar, EE.UU.) hasta un volumen total de 2 ml de medio por pocillo. El medio usado fue RPMI 1640, suplementado con L-glutamina 6 mM, gamicina (2 mL) y 10 a 15% de suero de ternera fetal (FCS) (laboratorios Flow). Se usaron dos pocillos como pocillos testigo. Las células se desarrollaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> y, al cabo de 24 horas, se observó que estaban aún en la fase crecimiento exponencial.

Las células se trataron después con las distintas fracciones (secadas) del extracto de las plantas o con extracto crudo. Las muestras se disolvieron en DMSO y se añadieron 4 µl a cada pocillo que contenía células y 2 ml de medio. La concentración final de DMSO fue menor que 0,02% por pocillo. Cada muestra fue ensayada (por triplicado) a una concentración final de 1, 10 y 100 µg/ml.

Después se contaron las células al cabo de 24, 48 y 72 horas de tratamiento.

La citotoxicidad de los compuestos se expresó en forma de valores de IC<sub>50</sub> (concentración de inhibición al 50%), siguiendo el ensayo con azul de metileno de Finlay *et al.*, 1984, esto es:

$$\text{porcentaje de crecimiento de las células \%} = \frac{\text{absorbancia de las células tratadas}}{\text{absorbancia de las células testigo}} \times 100$$

Se eliminó el medio de los pocillos y se añadieron 200 µl de azul de metileno por pocillo para realizar un periodo de incubación de una hora. Después los pocillos se lavaron con agua 3 veces y se secaron durante un día a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µl de Sarkosyl (1% en PBS, Sigma) y las placas de 24 pocillos se dejaron en el incubador durante 5 horas. Después se pasaron 100 µl por pocillo con puntas diferentes a placas de 96 pocillos de fondo plano.

Se leyeron los valores de la absorbancia en UV con un lector de microplacas a una longitud de onda de 595 nm.

Células epiteliales normales de tejido de ovario y mama, desarrolladas en placas de 24 pocillos y tratadas como se ha indicado anteriormente, fueron tripsinizadas al cabo de 24 y 48 horas. La viabilidad de las células se contó manualmente usando un hemocitómetro Neubauer, bajo microscopía óptica. Se usó el método de exclusión con azul de tripano. Se contaron un mínimo de 200 células. Se pudo observar poco efecto sobre la inhibición del crecimiento o la viabilidad de las células al cabo de 48 horas con los extractos crudos.

La citotoxicidad del extracto crudo fraccionado derivado de plantas de *Calomeria* de un año de edad (13 fracciones) fue evaluada y expresada como valores de IC<sub>50</sub> usando el ensayo con azul de metileno. Se usó la línea de células de cáncer de ovario JV (van Haaften-Day *et al.*, Cancer Res. 43 (8), 3725-31), y las fracciones 2, 4, 6 y 8 mostraron los niveles de citotoxicidad más elevados.

También se evaluó la viabilidad de las células después de la adición de azul Alamar (BioSource, Europa) (Page *et al.*, 1993) en las placas de 24 pocillos (100 µl de azul Alamar y 1 ml de medio por cada pocillo). El sobrenadante fue transferido a placas de 96 pocillos y se midió la absorbancia mediante un aparato Cytofluor. La Figura 3A muestra el porcentaje de actividad de las células de cáncer de ovario (van Haaften-Day *et al.*, (1990) Cancer 65 (8), 1753-51) tratadas con extracto crudo en cloroformo en distintas cantidades. Se observaron resultados similares cuando se usó un extracto en diclorometano en las células cancerosas.

La Figura 3B muestra el porcentaje de actividad de fibroblastos humanos de la piel normales, desarrollados en placas de 24 pocillos, tratados durante 72 horas con distintas concentraciones de extracto crudo, y la Figura 3C muestra el porcentaje de actividad de los linfocitos humanos, desarrollados en placas de 96 pocillos (Ansar Ahmed, 1994) a lo largo de 72 horas con las distintas concentraciones de extracto.

## ES 2 324 051 T3

La citotoxicidad del extracto de *Calomeria amaranthoides* se comparó también con la del Cisplatino (Pharma Chemie, Haarlem) y el Docetaxol (Aventis Pharma, Hoevelaken) usando fibroblastos de la piel humanos y la línea JC de cáncer de ovario (van Haaften-Day *et al.*, Cancer Res. 43 (8), 3725-31) (Figura 4). Los fibroblastos fueron tratados con 1, 10 ó 100  $\mu\text{g}$  del extracto de Calomeria ("CA"), Cisplatino ("Cplat") o Docetaxol ("Taxol") y la viabilidad celular se observó a las 48 horas después de la adición del tratamiento, y se registró mediante microfotografía (Figura 4A). Del mismo modo, la línea de células JC de cáncer de ovario fue tratada con 1, 10 ó 100  $\mu\text{g}$  de extracto de Calomeria, Cisplatino o Docetaxol, y la viabilidad celular se observó y se registró a las 48 horas (Figura 4B).

Mientras la citotoxicidad en los fibroblastos por el cisplatino o el docetaxol puede observarse a una dosis de 1  $\mu\text{g}$  a las 48 horas, teniendo lugar una mayor reducción en la viabilidad celular con 10  $\mu\text{g}$  y 100  $\mu\text{g}$  de uno cualquiera de los dos compuestos, se observa que el extracto de Calomeria muestra menos toxicidad en los fibroblastos, mostrando 1  $\mu\text{g}$  de extracto solamente una citotoxicidad mínima, e incluso a 10  $\mu\text{g}$  (Figura 4A). El extracto de Calomeria es por tanto menos tóxico en células representativas de un fenotipo normal que el cisplatino o el docetaxol.

En cambio, el extracto de Calomeria a 1, 10 o 100  $\mu\text{g}$  muestra una toxicidad similar a la del cisplatino a 1, 10 o 100  $\mu\text{g}$  en la línea de células JC de cáncer de ovario (Figura 4B). Las células JC parecían más resistentes al docetaxol. El docetaxol parece ser menos tóxico que el extracto de Calomeria o que el cisplatino, cuando los tratamientos se comparan al nivel de dosis de 10  $\mu\text{g}$  durante 48 horas.

En consecuencia, el extracto de Calomeria muestra mayor selectividad para la línea de células de cáncer de ovario que cualquiera de los dos productos cisplatino o docetaxol, lo que indica un efecto significativamente menor sobre las células representativas del fenotipo normal, a dosis que eran citotóxicas en células cancerosas.

Se encontró que los extractos de Calomeria causaban muerte celular apoptótica, caracterizada por cambios morfológicos tales como encogimiento, condensación y fragmentación de la célula y el núcleo.

La citotoxicidad de los extractos en la línea de células cancerosas L<sub>1210</sub> se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

Tratamiento	Dosis ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Índice inhibidor del crecimiento (%) IC50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 48 h después del tratamiento con el fármaco en la línea de células L <sub>1210</sub>
Testigo		
Extracto crudo en cloroformo	1	9
	10	93
	100	100
Extracto en etanol al 95%	1	6
	10	76
	100	100
III-P133		

Se observó también que las hojas tomadas de plantas que tenían 2 años de edad producían extractos que eran más citotóxicos que los extractos preparados a partir de hojas tomadas de la mismas plantas con 1 año de edad.

### Ejemplo 5

#### *Separación mediante HPLC del extracto crudo de Calomeria amaranthoides*

El extracto crudo y el extracto fraccionado de las hojas de plantas de dos años de *Calomeria amaranthoides* se analizaron usando un protocolo de HPLC.

## ES 2 324 051 T3

Se usaron cloroformo/metanol/agua 1:1:1 (v/v/v) para conseguir una separación clara en dos fases del extracto crudo de las hojas. La capa de cloroformo se secó después con sulfato sódico anhidro, se filtró y se secó con aire. El residuo resultante se disolvió después en disolvente para inyección en HPLC (hexano:dioxano 99,5:0,5, v/v).

5 Este método dio una solución clara en el disolvente anterior. La separación se realizó en columnas de HPLC de fase directa de sílice 5Si60 usando como eluyente hexano:dioxano 99,5:0,5, v/v (tiempo de ejecución 30 min, velocidad de flujo 2,5 ml/min, UV en el margen de longitudes de onda nm). Se inyectaron 50-100  $\mu$ g de muestra cruda por cada ejecución en columnas analíticas de 250 x 4,6 m d.i.

10 Además de analizar el extracto crudo, también se analizaron fracciones concentradas derivadas de la cromatografía en columna mediante HPLC en fase directa.

Las lecturas resultantes del análisis de HPLC de la Fracción 2, ejecutadas a distintas longitudes de onda, se muestran en las Figuras 2A a 2J.

15 Alternativamente, el extracto crudo fue cromatografiado en una columna LC-18-DB (fase inversa), 5  $\mu$  (250 x 4,6 mm d.i.). La separación se realizó con un tampón de fosfato sódico 50 mM y ácido heptanosulfónico 10 mM (el pH era 3,4; ejecución de 30-50 min; velocidad de flujo 1 ml/min, longitud de onda de UV 254 nm). Se inyectaron 20  $\mu$ l de extracto.

20

### Ejemplo 6

#### *Imagen de resonancia magnética nuclear de fracciones en cloroformo de Calomeria amaranthoides*

25

El extracto crudo en cloroformo derivado de *Calomeria amaranthoides* y las fracciones purificadas mediante cromatografía en columna bajo gravedad fueron analizadas usando espectroscopía de resonancia magnética nuclear en un espectrómetro de NMR Varian Gemini 300. El espectro de  $^1\text{H}$  NMR se obtuvo a 300 MHz y el de  $^{13}\text{C}$  NMR se obtuvo a 75 MHz.

30

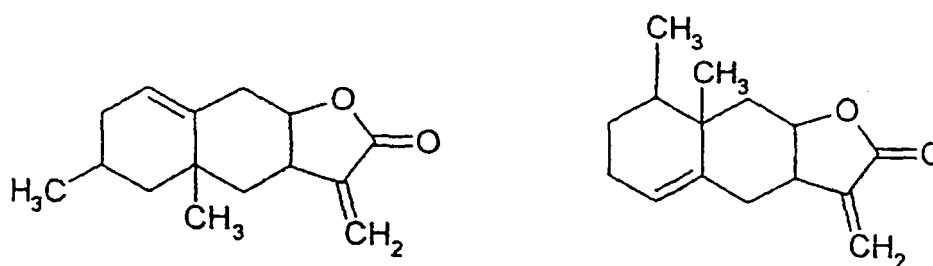
Una cantidad analítica de las 13 y 57 fracciones del extracto vegetal crudo se suspendió en 0,4 ml de PBS/D<sub>2</sub>O en un tubo de NMR de 5 mm de diámetro en la parte superior de un tapón de lana de vidrio, y después se pusieron en un tubo de NMR de 5 mm de diámetro que contiene 1 mmol/L de ácido p-aminobenzoico en PBS/D<sub>2</sub>O, que servía de referencia. Los espectros de  $^1\text{H}$  NMR se registraron a 37°C usando una cabeza de protones estándar de 5 mm de diámetro. El espectro de  $^1\text{H}$  NMR para la fracción 12 se muestra en la Figura 5A y el espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR para la fracción 12 se muestra en la Figura 5B.

35

El espectro de  $^1\text{H}$  NMR derivado de la fracción 12 era característico de las siguientes estructuras de tipo eudesmanolida:

40

45



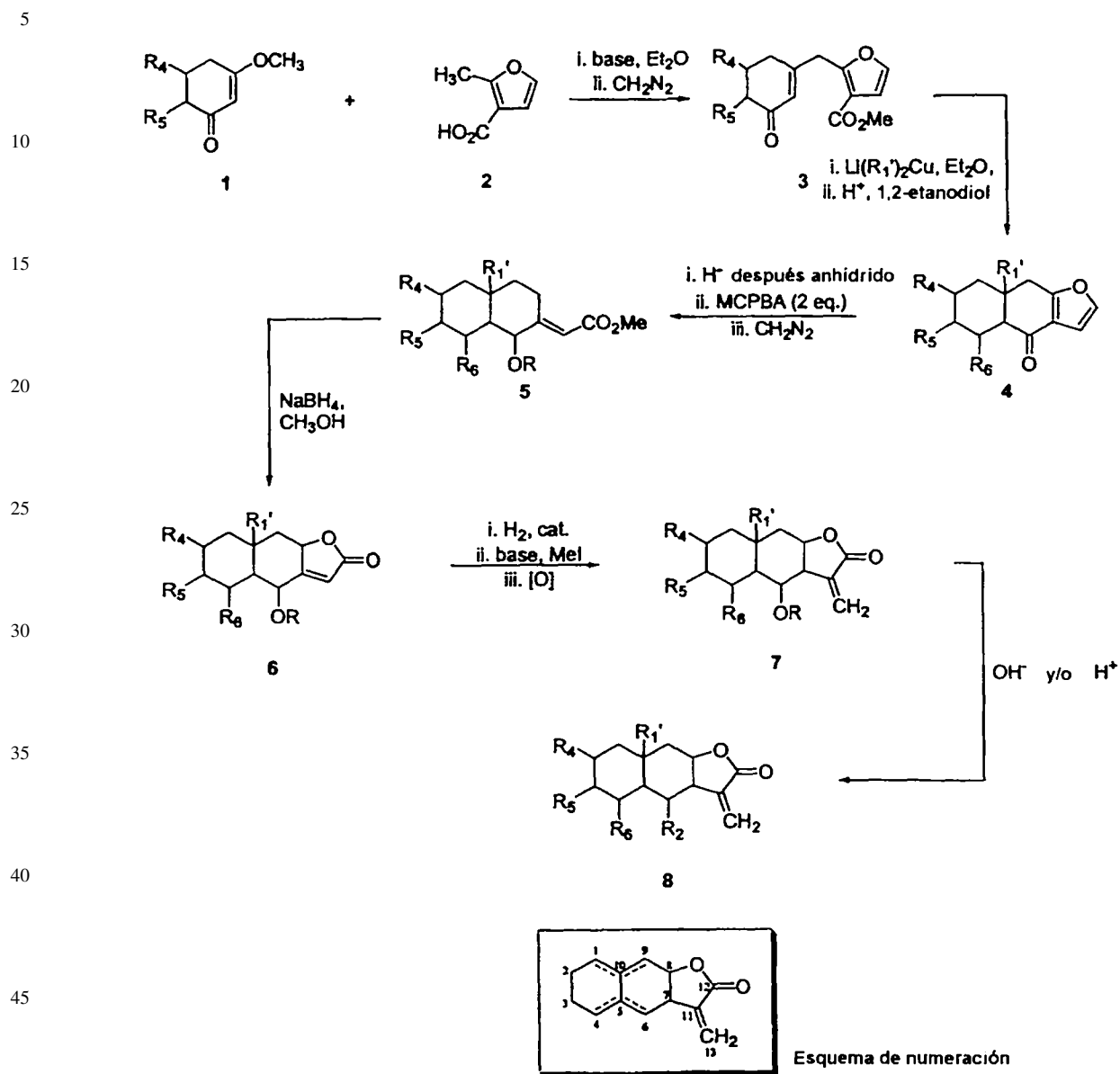
55

60

65

Ejemplo 7

Esquema de síntesis para los compuestos de Fórmula I



El tratamiento del ácido 2-metil-3-furoico (2) con una base adecuada viene seguido por la captura del dianión así generado con metoxiciclohexenona 1. El producto obtenido de esta reacción se trata con un exceso de diazometano para dar la sintona 3. El éster 3 se convierte directamente en el compuesto tricíclico 4 mediante el tratamiento con  $\text{Li}(\text{R}_1')_2\text{Cu}$ , seguido por la protección selectiva de la cetona  $\text{C}_4$ . La reducción del carbonilo  $\text{C}_6$  viene seguida después por la protección del hidroxilo resultante. Este material se trata después con dos equivalentes de ácido *m*-cloroperbenzoico (MCPBA) y a continuación con un exceso de diazometano, para dar el éster metílico de anillo abierto 5. El tratamiento de 5 con  $\text{NaBH}_4$  en metanol proporciona la enona tricíclica 6. Sometiendo esta enona a hidrogenación catalítica y a continuación metilando en  $\text{C}_{11}$  y oxidando los grupos metilo, se obtiene 7. La desprotección global de los grupos protectores proporciona después el compuesto 8.

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de una o más partes de una planta de *Calomeria amaranthoides* para ser usado como medicamento.

5 2. Un extracto de *Calomeria amaranthoides* que muestra actividad citotóxica hacia células que muestran condiciones asociadas con la división celular hiperproliferativa, para su uso en el tratamiento o en la profilaxis de cánceres sólidos y/o cánceres malignos hematopoiéticos.

10 3. El extracto según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el extracto es un extracto derivado de un disolvente orgánico.

4. El extracto según la reivindicación 3, en el que el disolvente orgánico es cloroformo.

15 5. El extracto según la reivindicación 3, en el que el extracto muestra un espectro de NMR de protón como se indica en las Figuras 5A y un espectro de <sup>13</sup>C NMR como se indica en la Figura 5B.

20 6. El extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde los cánceres sólidos incluyen tumores gastrointestinales, cáncer de hígado y tracto biliar, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma maligno, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, sarcomas y osteosarcomas, sarcoma de Kaposi, sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA y carcinoma de riñón.

7. El extracto según la reivindicación 6, en donde el cáncer sólido es cáncer de ovario.

25 8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

30 9. El uso de un extracto de *Calomeria amaranthoides* que muestra actividad citotóxica hacia células que muestran condiciones asociadas con la división celular hiperproliferativa, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de cánceres sólidos y cánceres malignos hematopoiéticos.

35 10. El uso según la reivindicación 9, en donde los cánceres sólidos incluyen tumores gastrointestinales, cáncer de hígado y tracto biliar, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma maligno, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, sarcomas y osteosarcomas, sarcoma de Kaposi, sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA y carcinoma de riñón.

40 11. El uso según la reivindicación 9, en donde el cáncer sólido es cáncer de ovario.

40

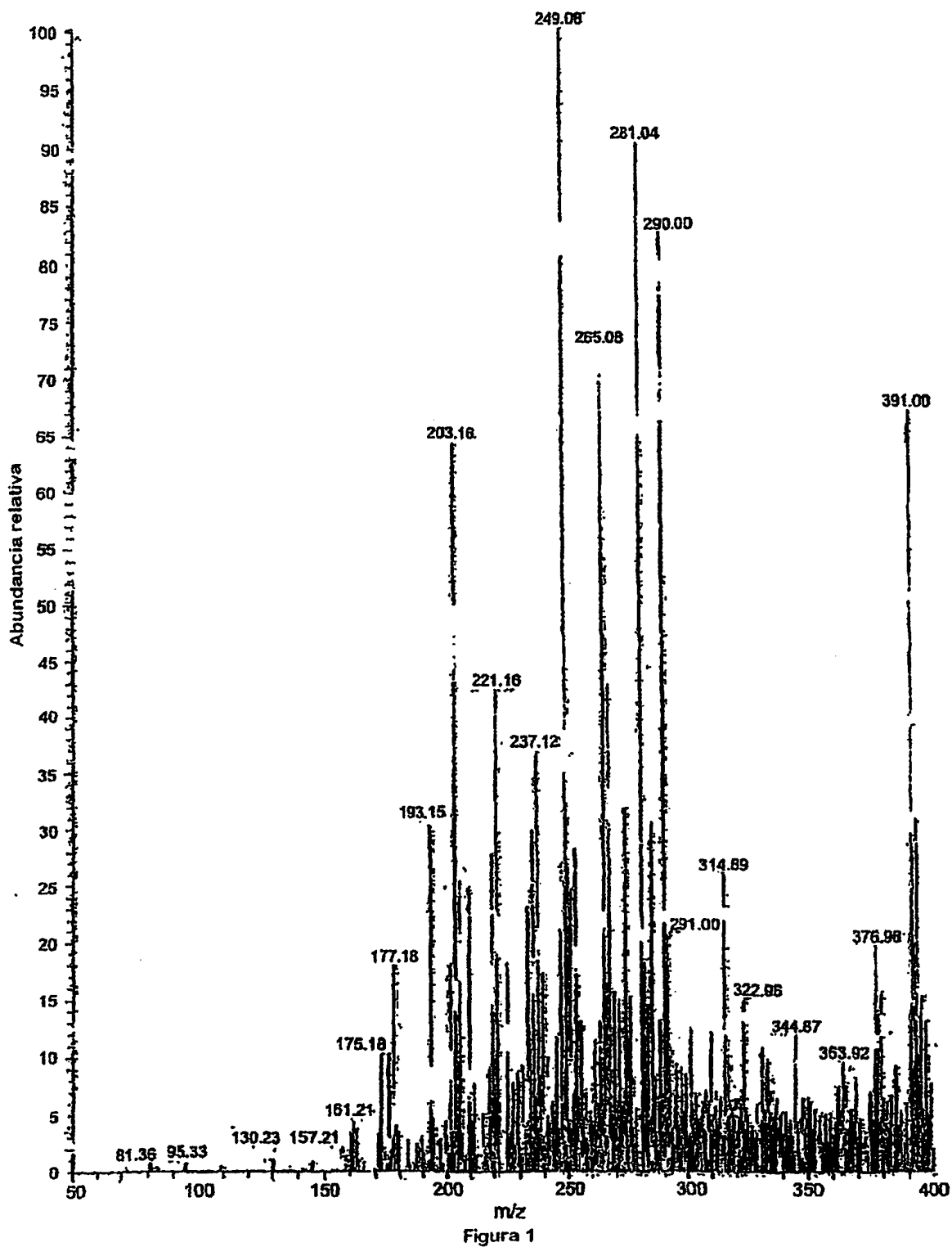
45

50

55

60

65



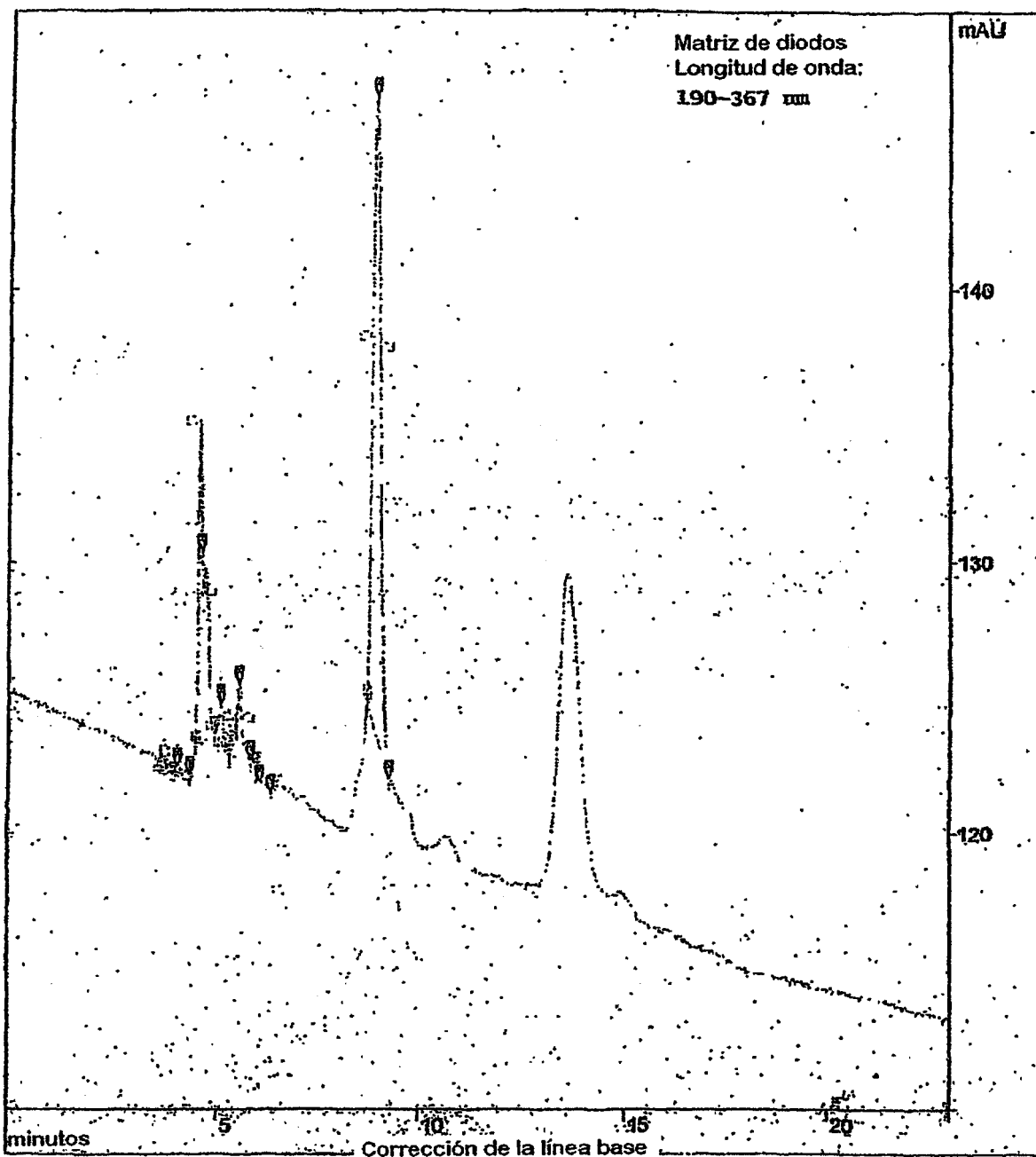


Figura 2A

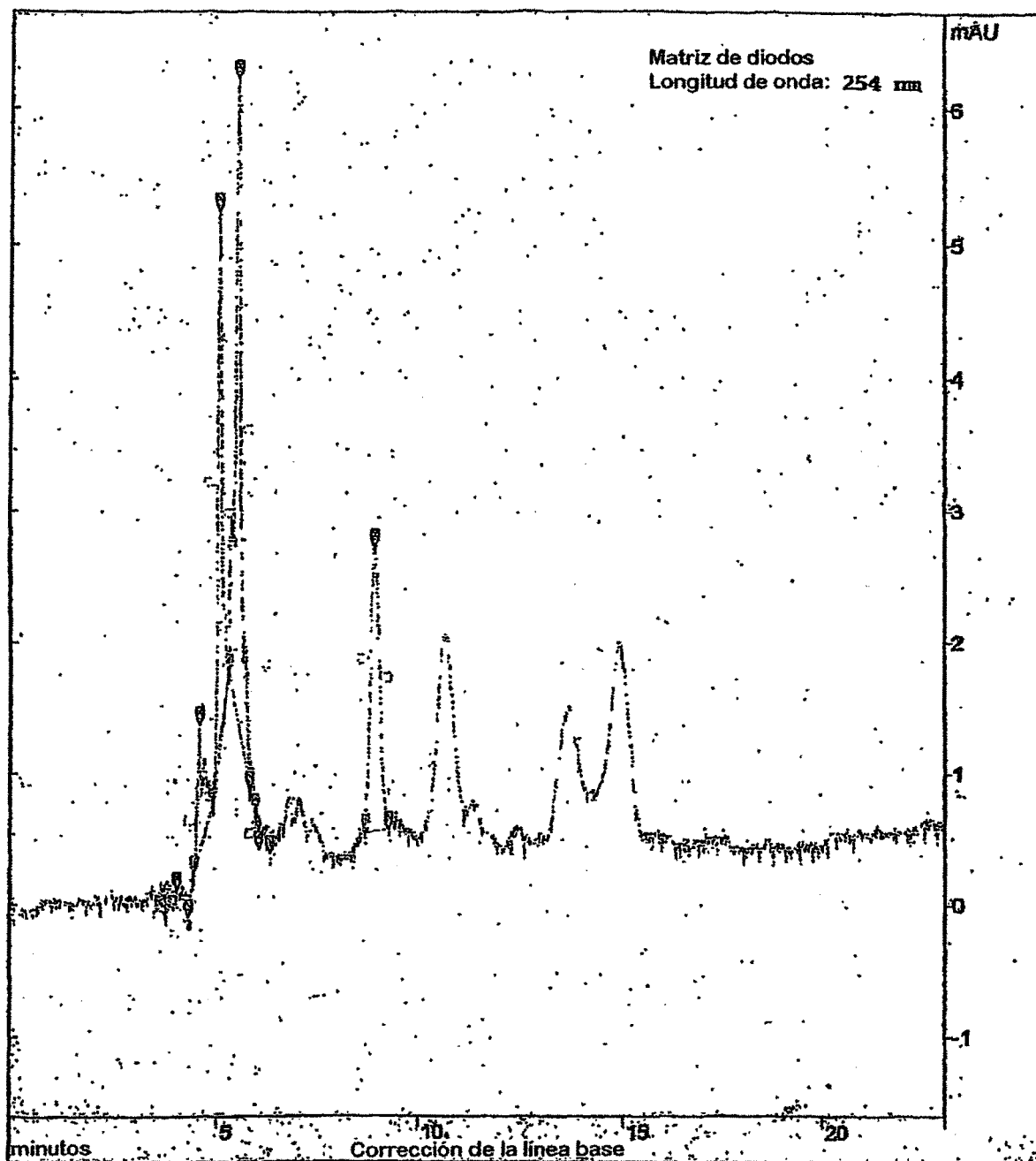


Figura 2B

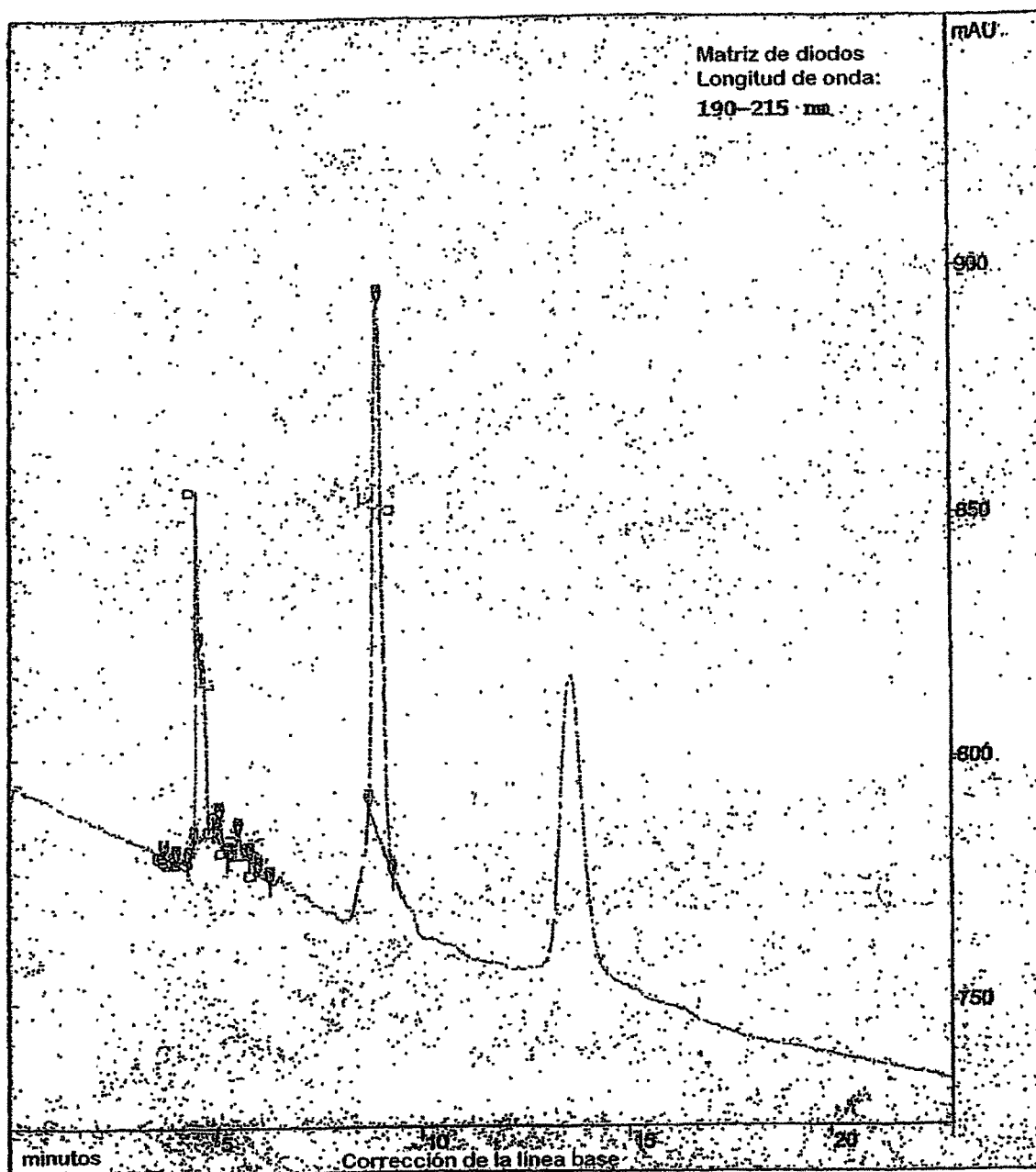


Figura 2C

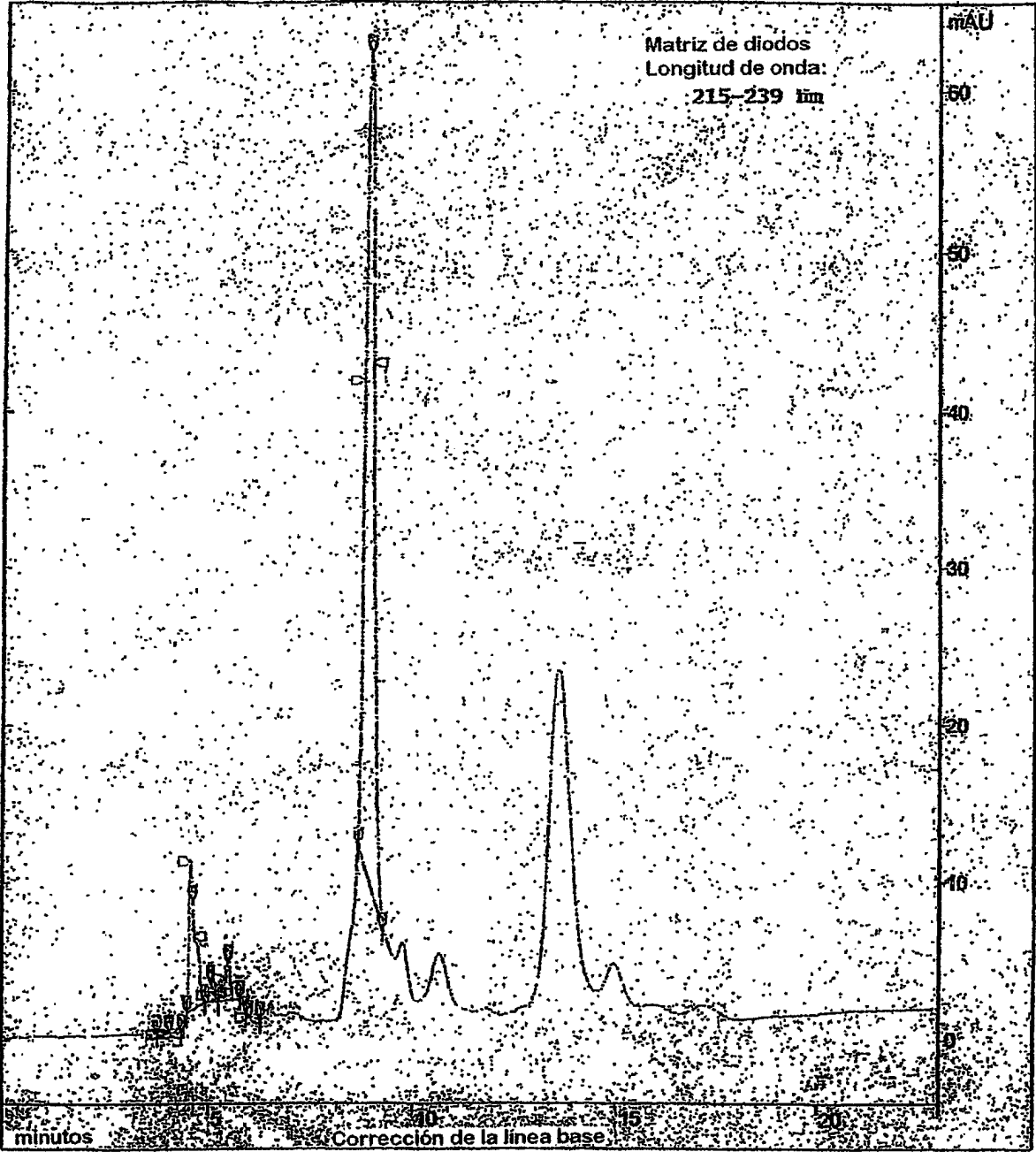


Figura 2D

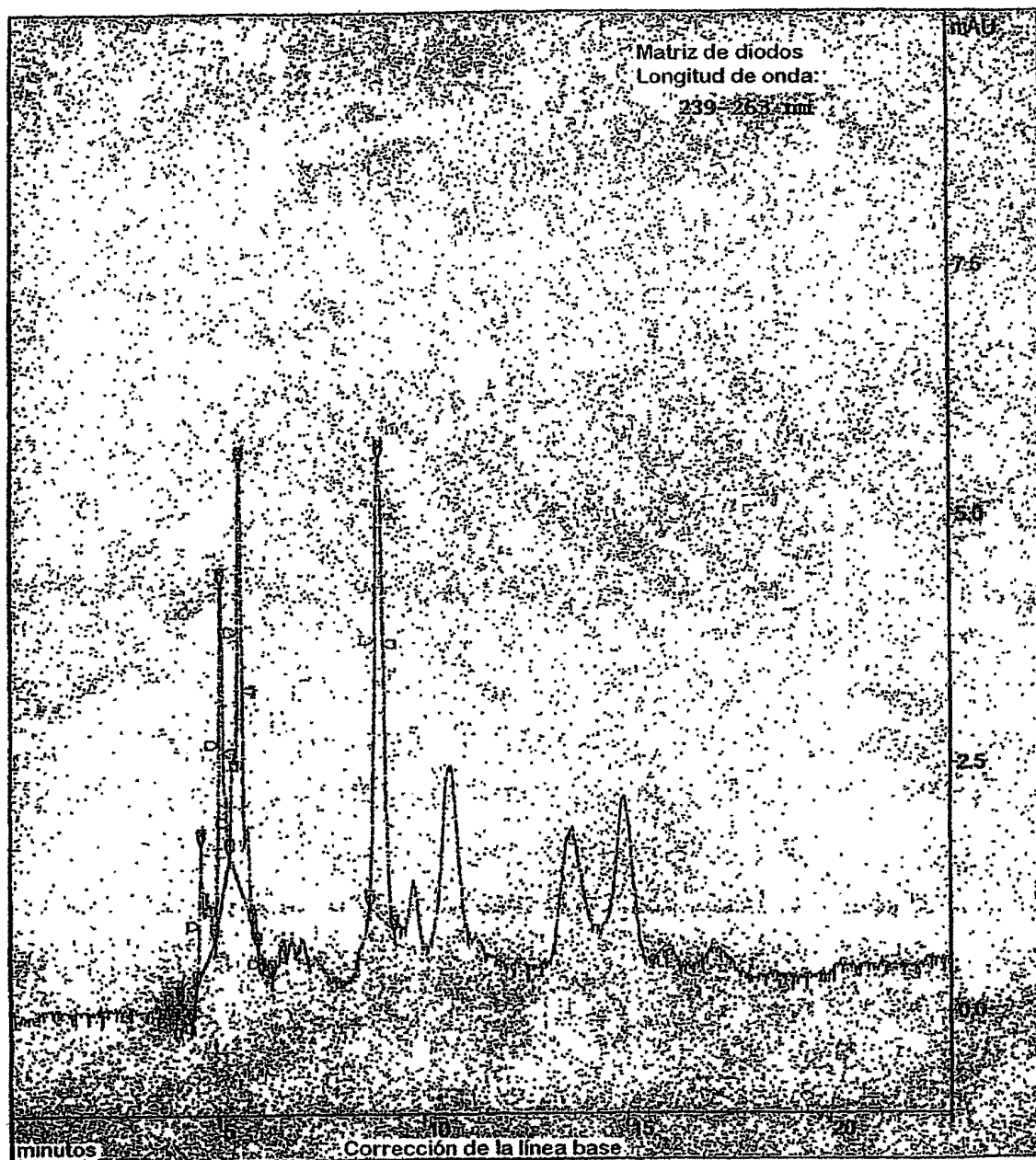


Figura 2E

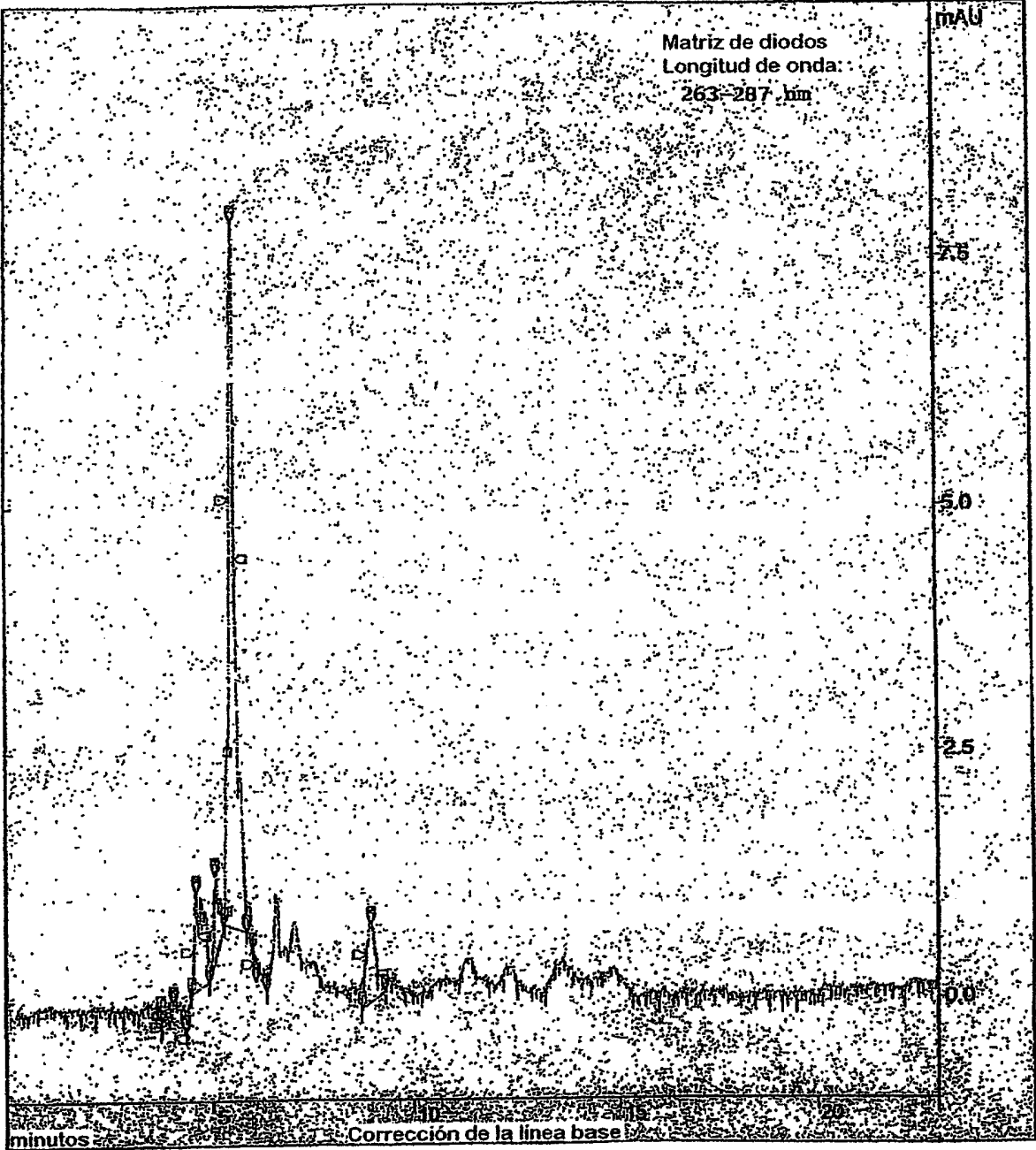


Figura 2F

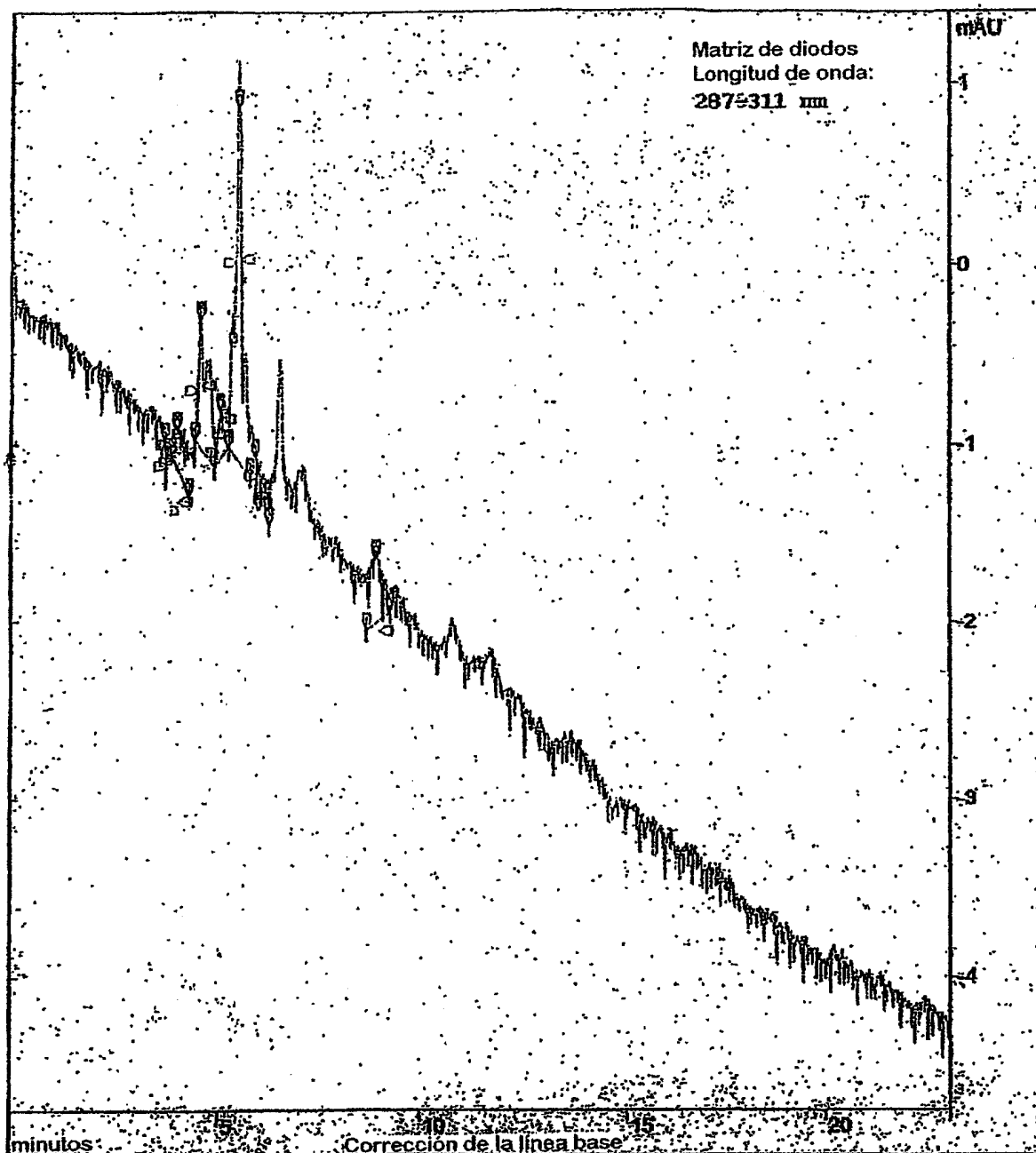


Figura 2G

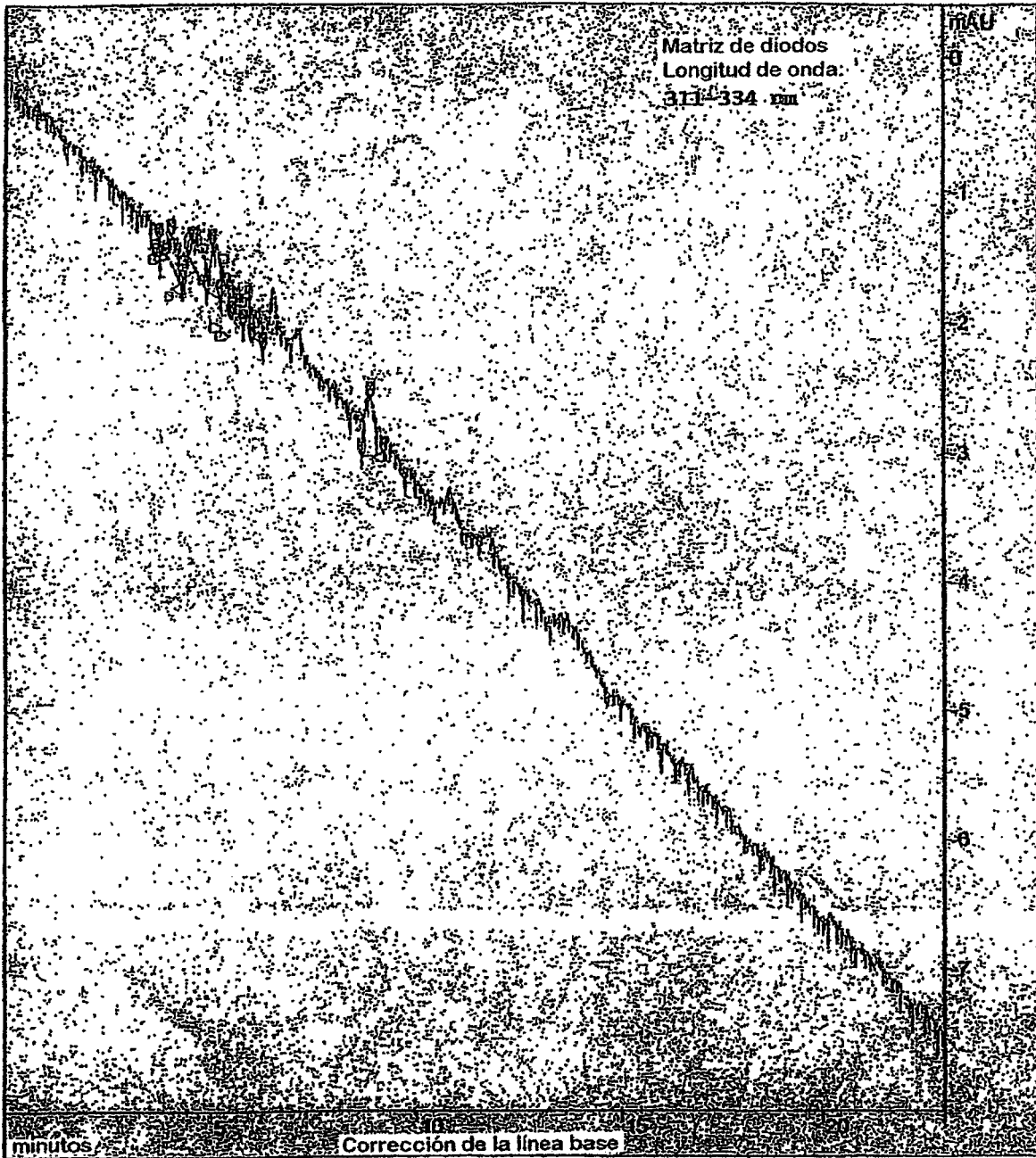


Figura 2H

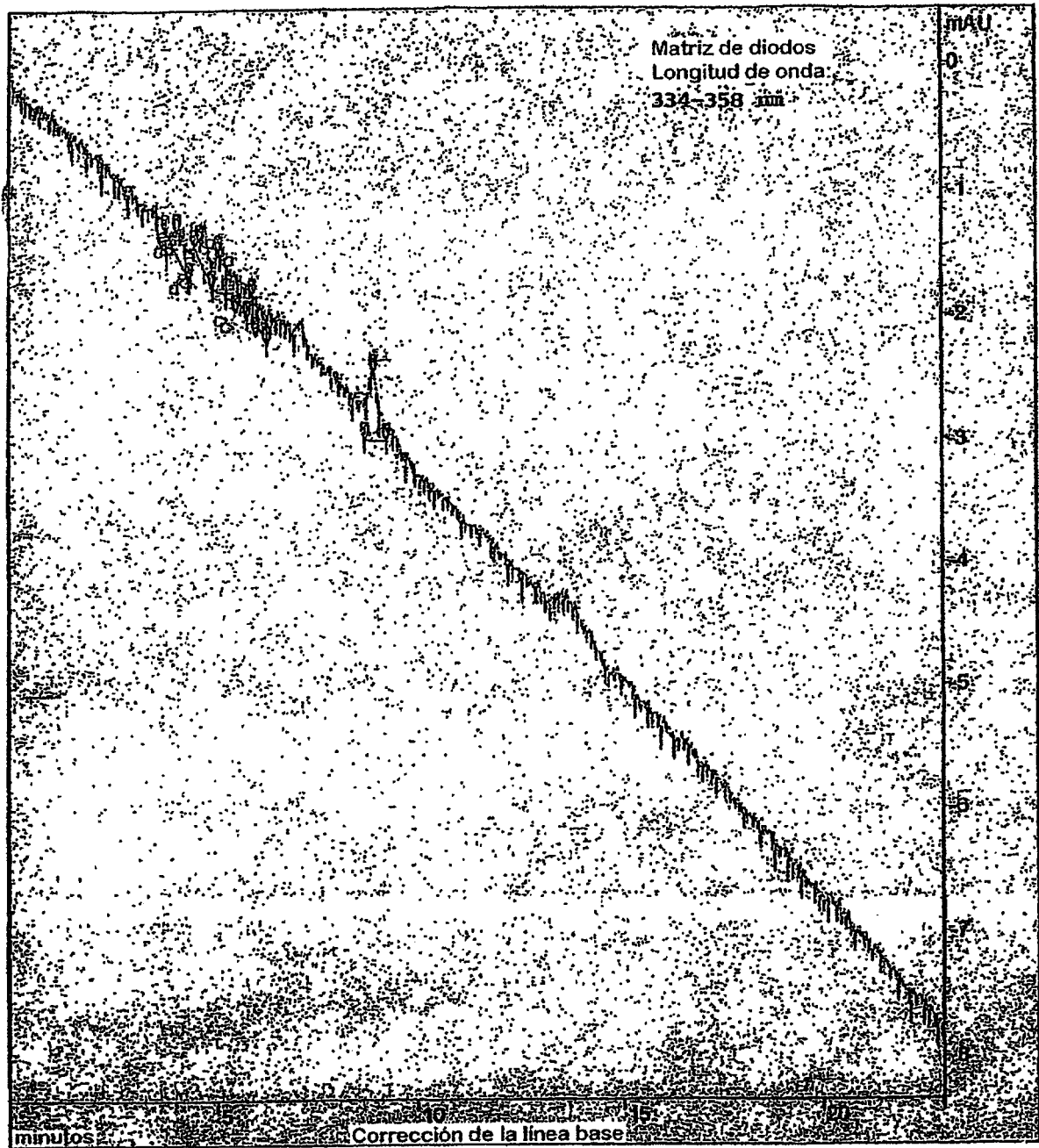


Figura 2I

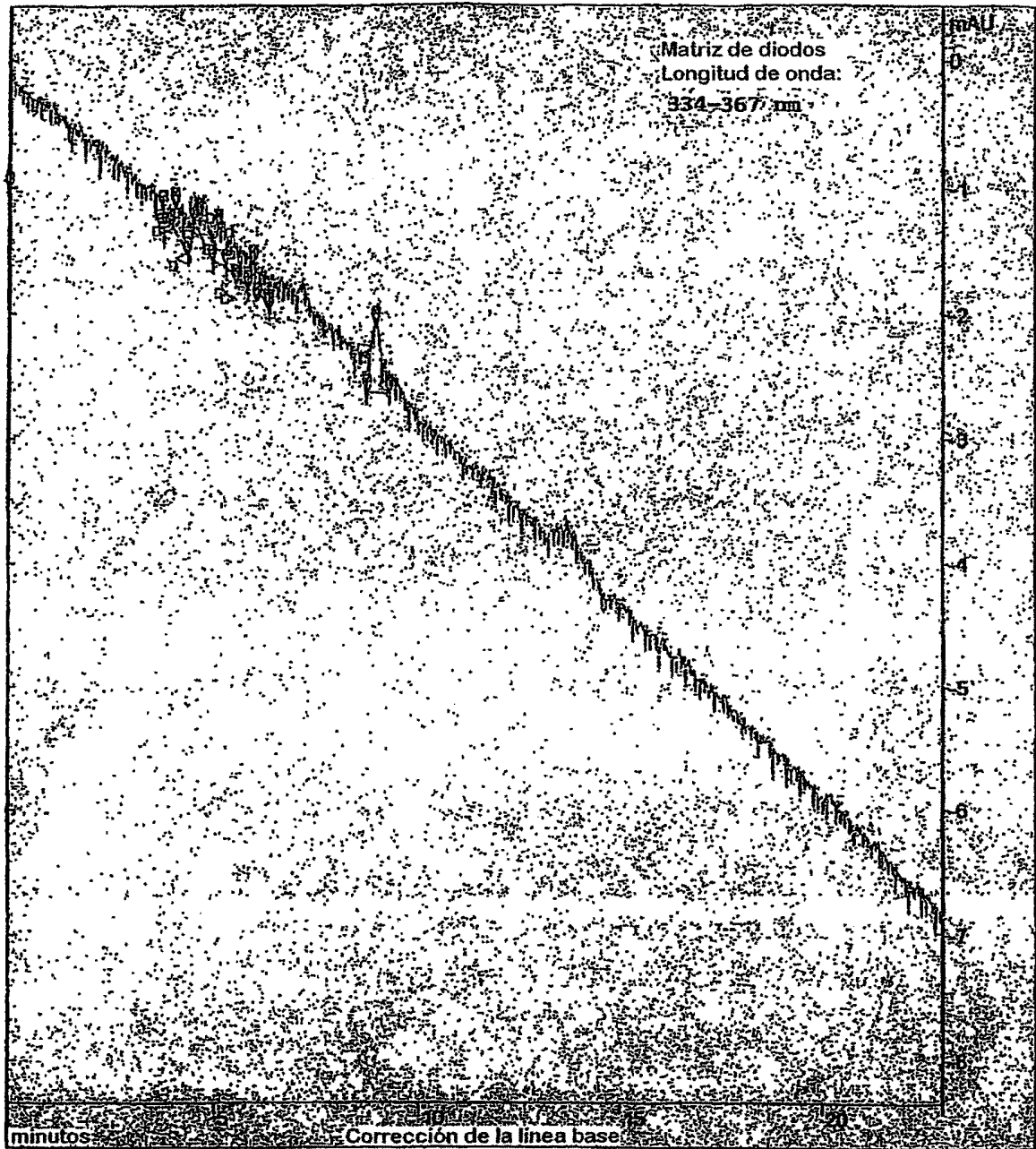
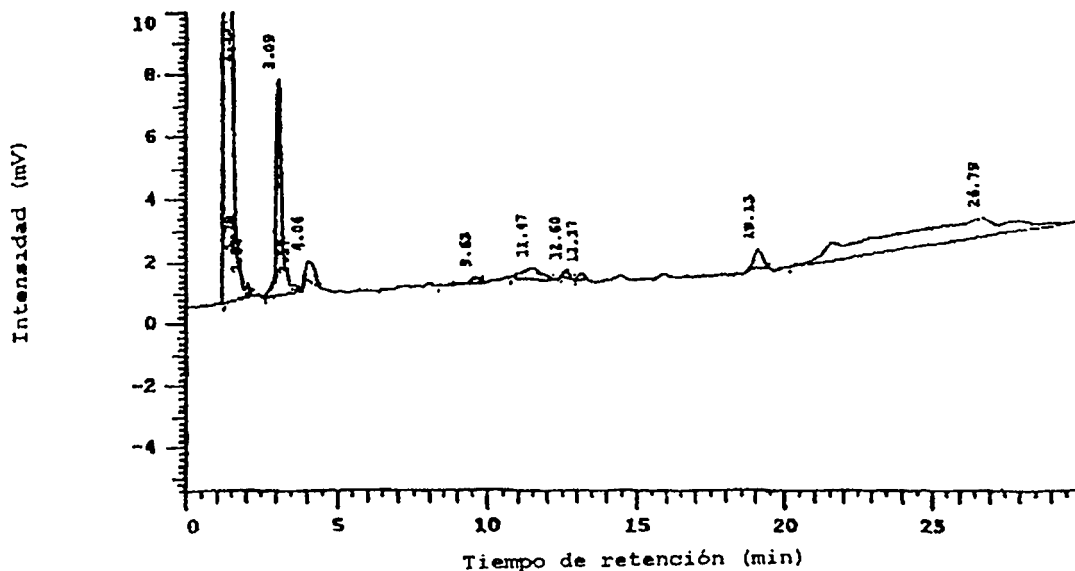


Figura 2J

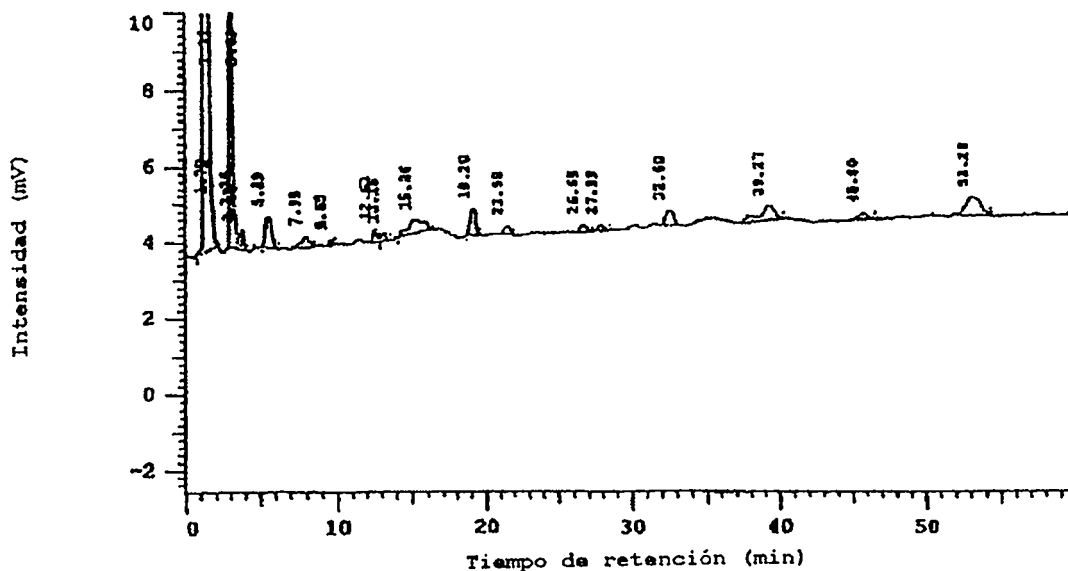


No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.33	953518	73.894	BY
2	1.78	1417	0.110	TBB
3	2.04	2093	0.162	TBB
4	3.09	70140	5.436	BB
5	3.57	2112	0.164	TBB
6	4.06	11373	0.881	BB
7	9.63	6226	0.483	BB
8	11.47	17537	1.359	BB
9	12.60	3016	0.234	BB
10	13.17	3004	0.233	BB
11	19.13	10563	0.819	BB
12	26.79	209375	16.226	BB
		1290374.	100.000	

Nivel rechazo de pico: 0

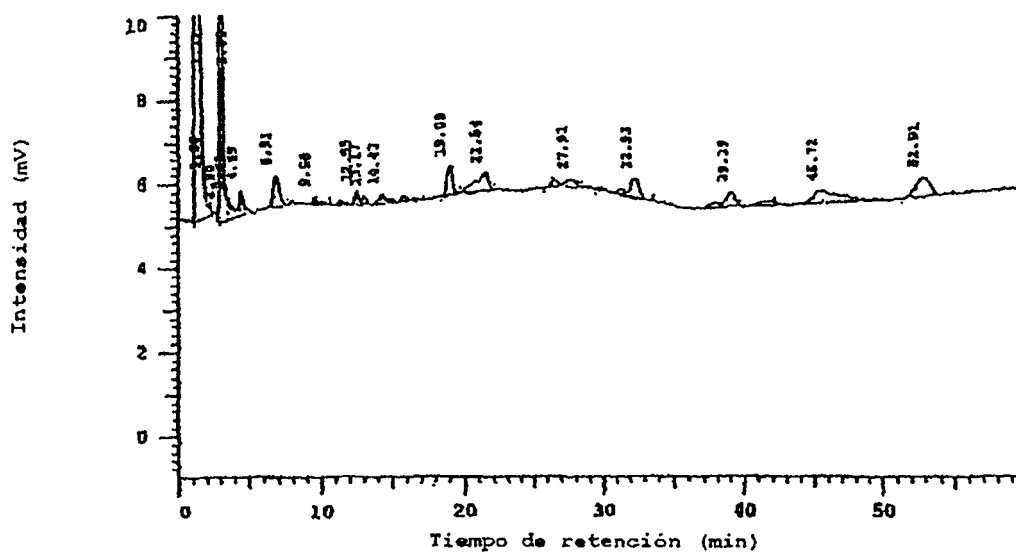
Indicador de página 1 / 3

Figura 2K



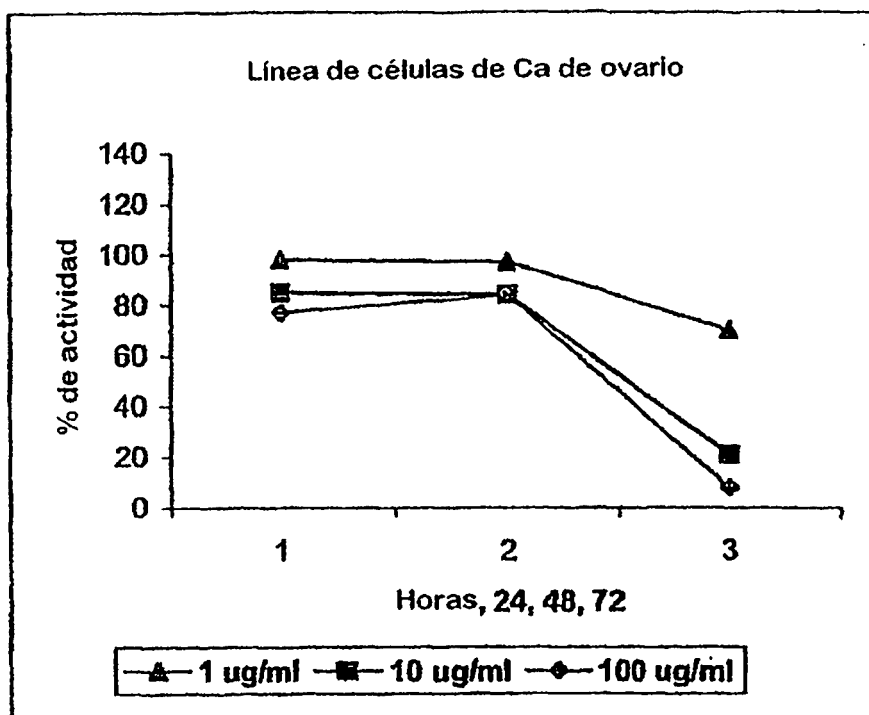
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.32	946784	78.151	MC
2	1.79	8016	0.662	MC
3	3.09	46910	3.872	MC
4	3.36	26258	2.167	MC
5	3.58	3061	0.253	MC
6	3.83	6128	0.506	MC
7	5.59	19205	1.585	MC
8	7.99	9429	0.778	MC
9	9.65	1956	0.162	MC
10	12.63	5278	0.436	MC
11	13.15	4088	0.337	MC
12	15.26	24562	2.028	MC
13	19.20	15561	1.284	MC
14	21.50	5846	0.483	MC
15	26.69	5886	0.486	MC
16	27.99	5414	0.447	MC
17	32.60	13419	1.108	MC
18	39.27	26056	2.151	MC
19	45.80	6073	0.501	MC
20	53.28	31544	2.604	MC
		1211474	100.000	

Figura 2L



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.31	938519	76.158	BV
2	1.80	5935	0.482	MC
3	2.90	0	0.000	
4	3.09	62404	5.064	MC
5	3.61	4296	0.349	MC
6	4.49	7970	0.647	MC
7	6.91	18767	1.523	MC
8	9.56	3875	0.315	MC
9	12.55	5956	0.483	MC
10	13.17	3124	0.254	MC
11	14.43	10865	0.882	MC
12	19.08	15540	1.261	MC
13	21.54	24696	2.004	MC
14	27.91	14523	1.179	MC
15	32.53	26292	2.129	MC
16	39.19	20511	1.664	MC
17	45.72	38032	3.086	MC
18	52.91	31063	2.521	MC
		1232318	100.000	

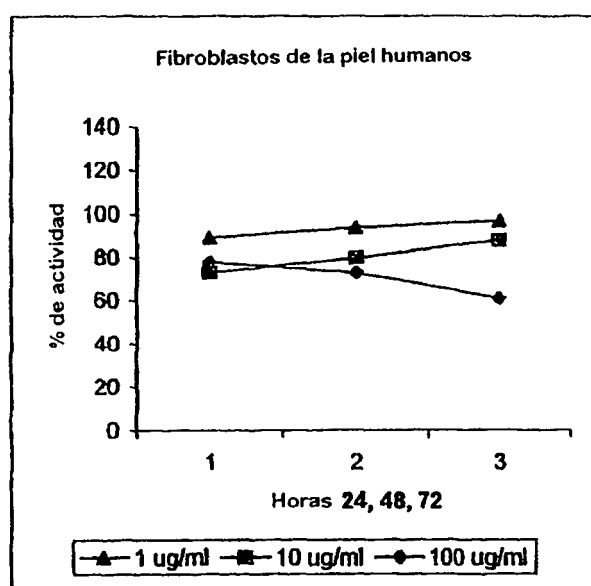
Figura 2M



Línea de células de Ca de ovario

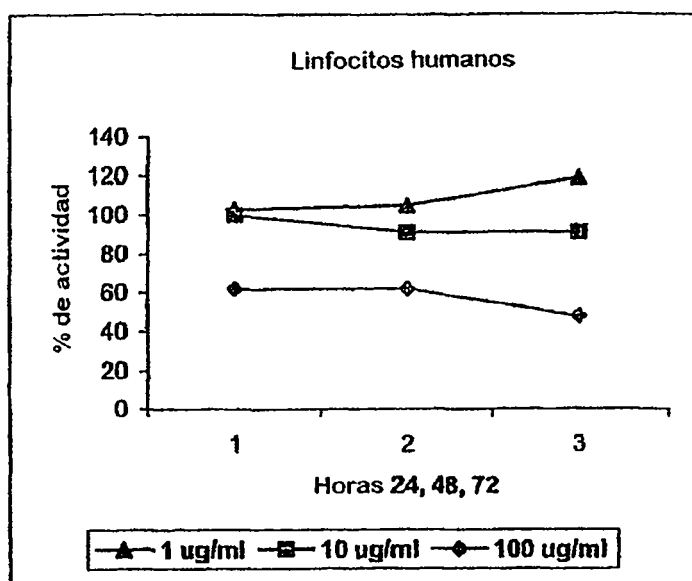
24	98	85	77
48	97	84	84
72	70	21	8

Figura 3A



Fibroblastos de la piel humanos			
24	48	72	72
89	94	97	73
73	80	88	73
78	73	61	61

Figura 3B



Linfocitos humanos

24	103	100	62
48	105	91	62
72	119	91	48

Figura 3C

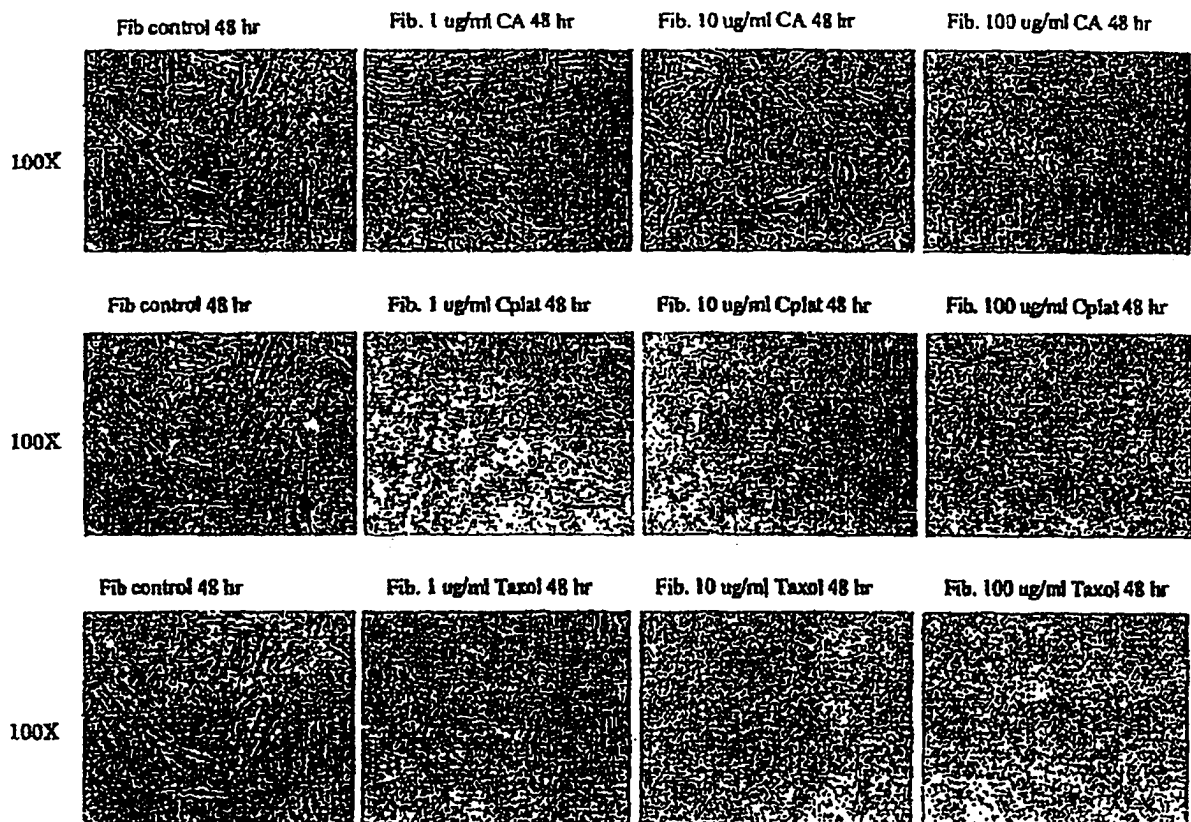


Figura 4A

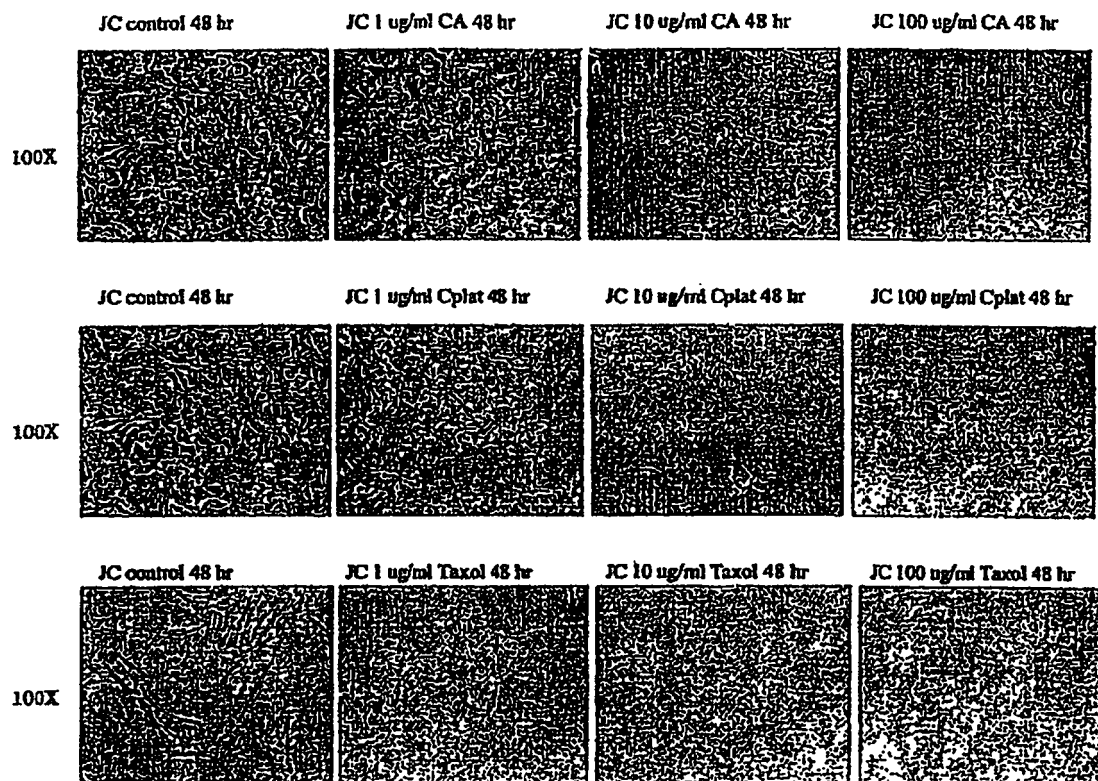


Figura 4B

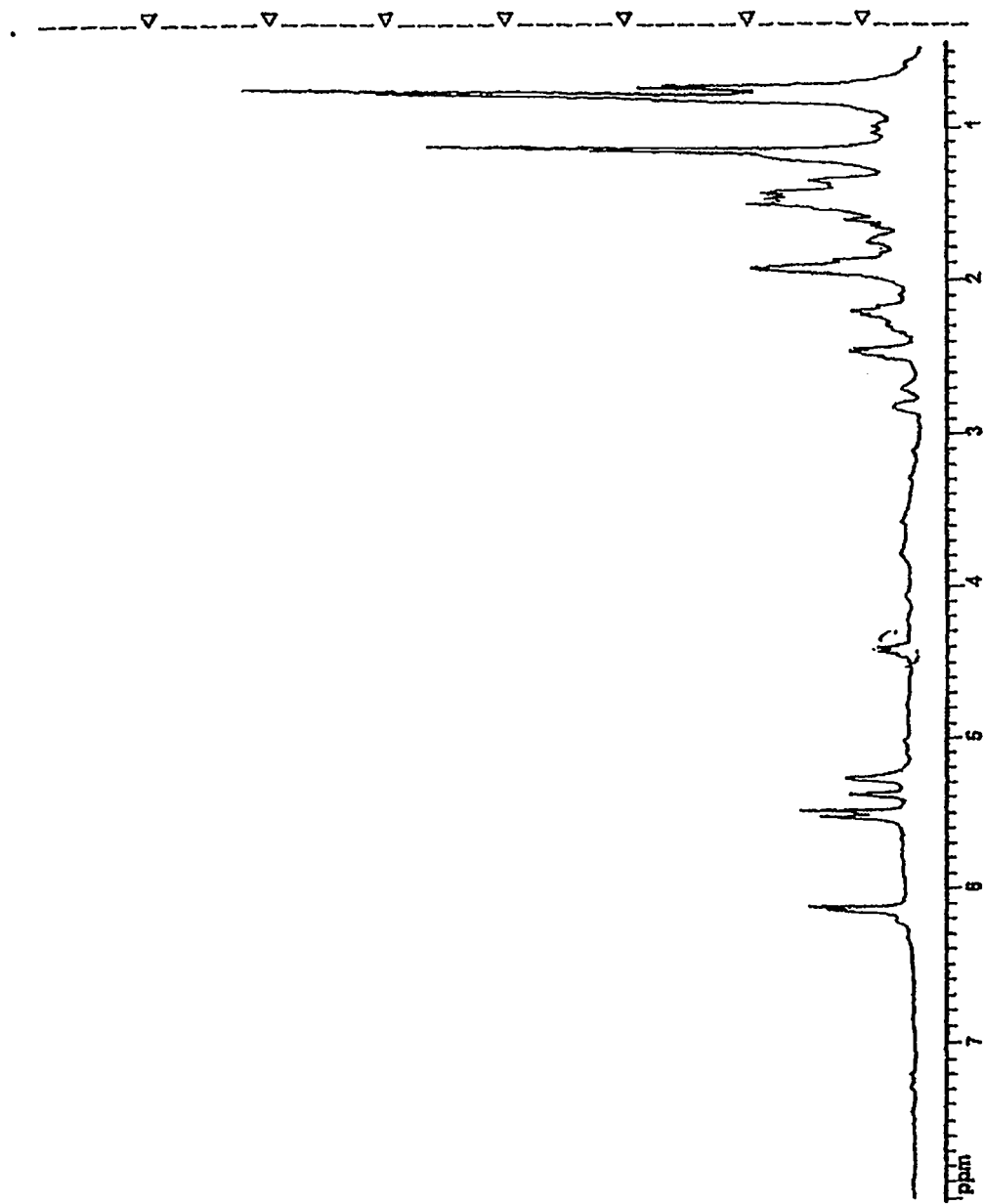


Figura 5A

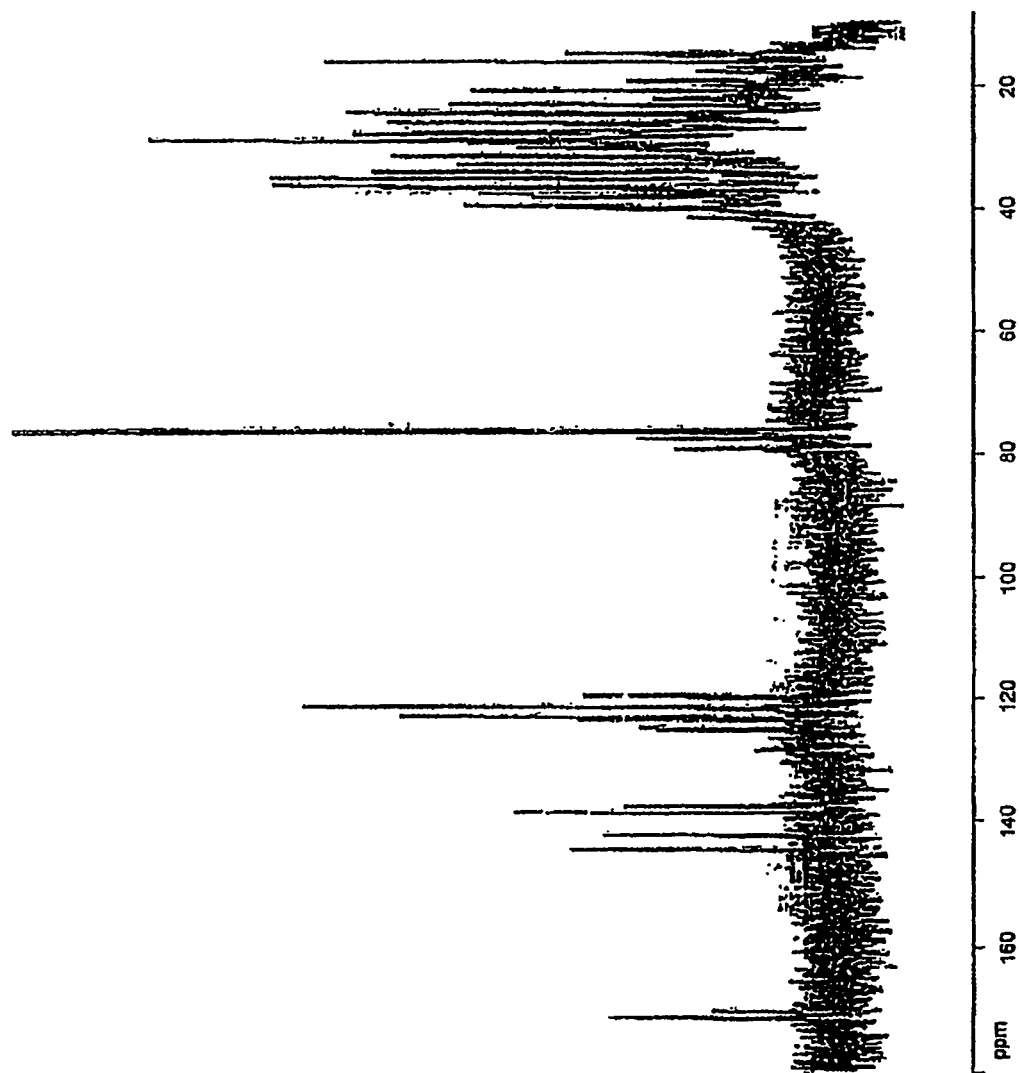


Figura 5B

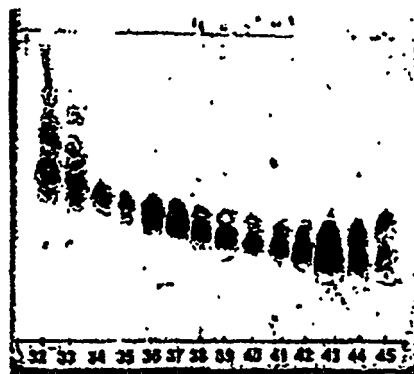
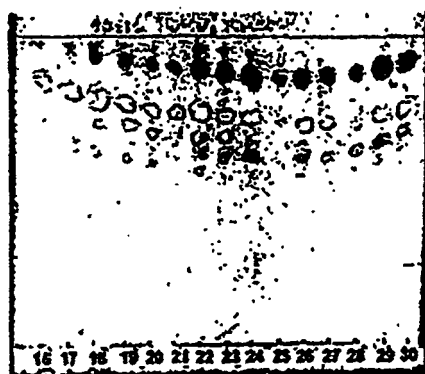
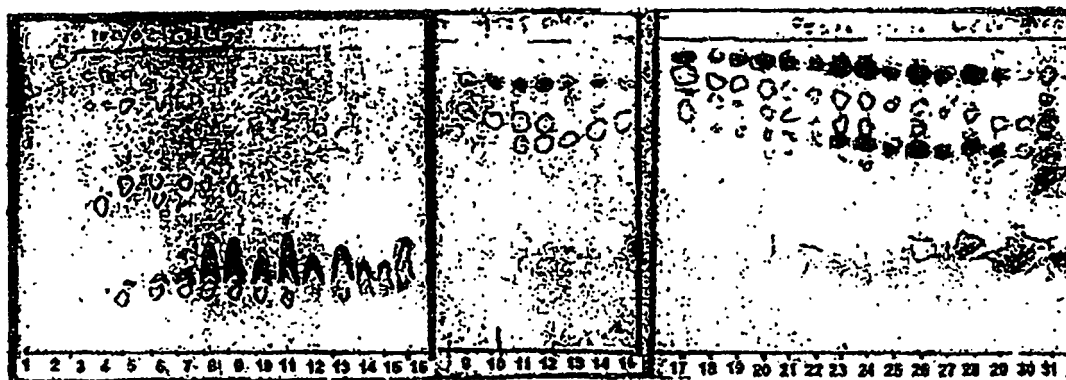


Figura 6A