



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 322**

51 Int. Cl.:
A61K 36/185 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02777223 .5**

86 Fecha de presentación : **26.09.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1429795**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2004**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de extractos de *Pelargonium sidoides* y/o *Pelargonium reniforme*.**

30 Prioridad: **27.09.2001 DE 101 47 644**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es: **Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG.**
Willmar-Schwabe-Strasse 4
76227 Karlsruhe, DE

72 Inventor/es: **Erdelmeier, Clemens;**
Hauer, Hermann y
Koch, Egon

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de extractos de *Pelargonium sidoides* y/o *Pelargonium reniforme*.

5 El presente invento se refiere a un procedimiento para la preparación de extractos de *Pelargonium sidoides* y/o *Pelargonium reniforme*

10 La *Pelargonium sidoides* es una planta que se utiliza tradicionalmente en el África del Sur ya desde hace mucho tiempo como medicamento en el caso de trastornos gastrointestinales y en el caso de enfermedades de las vías respiratorias, inclusive la tuberculosis. El inglés Stevens descubrió la droga medicamentosa en el año 1897 y se la trajo a Inglaterra. Allí se obtuvieron realmente ciertos éxitos en tratamientos que condujeron a que la droga fuese introducida en la terapia por Secheyne en Suiza. Ella se utilizó sobre todo en forma de formulaciones homeopáticas para curas durante varias semanas destinadas a la prevención de la tuberculosis en los casos de niños y adultos predispuestos (Kolodziej, H., Kayser, O., Z. Phytother. 19, 141-151, (1998)).

15 Además, como propiedades farmacológicas de la *Pelargonium sidoides* se han de mencionar de manera general unos efectos antibacterianos contra algunos gérmenes gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* β -hemolizantes) y gram-negativos (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*) (Kayser, O., Kolodziej, H., Planta Med. 63, 508-510 (1997)).

20 La especie *Pelargonium sidoides* fue clasificada durante mucho tiempo en lo que se refiere a su sistemática botánica como una variedad natural de *Pelargonium reniforme*. Por lo tanto, en la bibliografía más antigua no se ha realizado ninguna separación clara entre *Pelargonium sidoides* y *Pelargonium reniforme* (Kolodziej, H., Kayser, O., Z. Phytother. 19, 141-151, (1998)). A causa de la gran similitud botánica de *Pelargonium sidoides* con la especie afín *Pelargonium reniforme* se ha de partir de la premisa de que, por regla general, las raíces de *Pelargonium sidoides* que proceden de recolecciones silvestres contienen unas proporciones variables de *Pelargonium reniforme*.

25 Las sustancias constituyentes principales de las raíces de *Pelargonium sidoides* son las proantocianidinas, que están constituidas predominantemente por unidades de catecol y galocatecol (Kayser, O., Tesis Doctoral, Fachb. Pharm. Freie Univ. (FU = Universidad Libre de la Especialidad Farmacéutica) Berlin, páginas 23-24 y 51-55 (1997)). Además, se presentan cumarinas sencillas, con un grado de oxigenación por regla general alto en la estructura fundamental de la cumarina. Ésta parece ser una característica estructural relativamente típica para las *Pelargonium* (Kayser, O., Kolodziej, H., Phytochemistry 39, 1.181-1.185 (1995); Latté, K. P., Kayser, O., Tan, N., Kaloga, M., Kolodziej, H., Z. Naturforsch. 55c, 528-533 (2000)).

30 Los extractos procedentes de raíces de *Pelargonium sidoides* y/o *Pelargonium reniforme* se preparaban hasta ahora usualmente p.ej. mediante una sencilla maceración mediando utilización de una mezcla de acetona y agua 4/1 (Kayser, O., Kolodziej, H., Phytochemistry 39, 1.181-1.185 (1995)) o respectivamente de metanol puro en el procedimiento de Soxhlet (Bladt, S.; Wagner, H. Dtsch. Apoth.-Ztg. 128, 292-296 (1988)). Para la aplicación terapéutica, se utilizaron también extractos puramente acuosos (Kolodziej, H., Kayser, O., Z. Phytother. 19, 141-151 (1998)). En el comercio es obtenible un extracto etanólico, diluido con glicerol, de *Pelargonium reniforme/sidoides* (Lista Roja (Rote Liste) 2001).

35 Las desventajas de los procedimientos actuales de extracción se sitúan en unos rendimientos relativamente bajos, o respectivamente en una fuerte carga térmica (Soxhlet).

40 El presente invento está basado en la misión de poner a disposición un procedimiento moderado mejorado para la preparación de extractos de *Pelargonium sidoides* y *Pelargonium reniforme*, con el que se obtengan unos extractos en unos rendimientos más altos, debiéndose de mejorar, sin embargo, simultáneamente el efecto de los extractos.

45 A fin de solucionar los problemas planteados por estas misiones, en el presente invento se describe un procedimiento para la preparación de un extracto de *Pelargonium sidoides* y/o *Pelargonium reniforme*, caracterizado porque las raíces de *Pelargonium sidoides* y/o *Pelargonium reniforme* son sometidas o bien a una percolación o a una maceración en dos etapas. La percolación, y respectivamente la maceración doble, se llevan a cabo preferiblemente con disolventes acuosos etanólicos. Un disolvente preferido es un etanol al 10-92% en peso y en particular un etanol al 10-60% en peso. La percolación se puede efectuar también macerando las raíces con el disolvente, pudiéndose efectuar la maceración y la subsiguiente percolación propiamente dicha respectivamente con un etanol acuoso de concentración igual o distinta. En el último caso la maceración se efectúa preferiblemente con un etanol acuoso en una concentración relativamente más alta, tal como un etanol al 35% en peso y la subsiguiente percolación se efectúa con un etanol acuoso relativamente menos concentrado, tal como un etanol al 5% en peso, p.ej. en la relación de 2:8, para que la concentración media del etanol utilizado se sitúe en los intervalos indicados (10-92% en peso, preferiblemente 10-60% en peso). En el ejemplo precedente, resulta una concentración media ponderada de 11% en peso de etanol [(35 x 2 + 5 x 8) / 10% en peso]. Los extractos obtenidos conforme al invento tienen, después de la desecación, un contenido de fenoles totales de por lo menos 15%, preferiblemente de por lo menos 18%. Los extractos de este tipo se adecuan especialmente bien para el tratamiento de enfermedades inflamatorias e infecciones agudas y crónicas.

Los rendimientos de los extractos secos en el caso de la percolación conforme al invento (Ejemplos 1 hasta 4) y en el caso de la maceración en dos etapas conforme al invento con un etanol al 11 hasta 60% en peso (Ejemplos 5 hasta 8) son aproximadamente el doble de altos que en el caso de una maceración sencilla de modo correspondiente a la prescripción de la DAB [Farmacopea Alemana] (Ejemplo de comparación 1).

En el caso de los ensayos de extracción de raíces secadas de *Pelargonium sidoides* con mezclas de agua y etanol se comprobó de modo sorprendente que, con un contenido creciente de etanol en el agente de extracción, el contenido de fenoles totales en el extracto resultante aumenta de una manera constante y no, como hubiera sido de esperar, se pasa por un punto máximo en el caso de unas concentraciones intermedias de etanol. Tanto en el caso de la percolación (Ejemplos 1 hasta 4) como también en el caso de la maceración en dos etapas (Ejemplos 5 hasta 9), los contenidos de fenoles totales han aumentado frente a la maceración sencilla (Ejemplo de comparación 1), pudiéndose alcanzar el factor 3, según sea el disolvente para extracción.

Paralelamente a los contenidos de fenoles totales aumenta también el potencial antioxidante de los extractos. En este caso, los extractos conformes al invento son superiores a los extractos comparativos según los Ejemplos de comparación 1 y 2. Puesto que los contenidos de cumarinas totales en los extractos permanecen prácticamente constantes, independientemente del procedimiento y del disolvente, se ha de partir del hecho de que las cumarinas sólo prestan una contribución no esencial para el efecto antioxidante.

A partir de la comparación de los Ejemplos 1 (maceración con un etanol al 35% en peso y percolación con un etanol al 5% en peso), 2 (maceración con un etanol al 11% en peso y percolación con un etanol al 11% en peso) y 4 (percolación con un etanol al 11% en peso sin ninguna precedente maceración), para el extracto de acuerdo con el Ejemplo 1 resulta el rendimiento más alto y para el extracto de acuerdo con el Ejemplo 4 resulta el contenido más alto de fenoles totales. El potencial antioxidante se sitúa para los extractos de acuerdo con los Ejemplos 1 y 4 un poco por encima del que presenta el extracto de acuerdo con el Ejemplo 2. También los valores de CI_{50} (concentración inhibitoria del 50%) para la inhibición de la elastasa coinciden casi en el caso de los extractos de acuerdo con los Ejemplos 1 y 4, mientras que el valor de CI_{50} para el extracto de acuerdo con el Ejemplo 2 está situado en un valor comparativamente alto, con 8,4 $\mu\text{g/ml}$. Por consiguiente, los procedimientos de acuerdo con los Ejemplos 1 y 4 se prefieren con respecto al procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 2. Es decir, que la percolación sin ninguna maceración y la percolación con una maceración mediante un etanol más concentrado y la percolación con un etanol menos concentrado, se prefieren frente a un procedimiento, en el que la maceración y la percolación se efectúan con un etanol de la misma concentración.

El preparado que se encuentra en el comercio a base de *Pelargonium reniforme/sidoides* se emplea sobre todo para el tratamiento de infecciones agudas y crónicas, especialmente de las vías respiratorias y de la zona del cuello, la nariz y los oídos. Como efectos farmacológicos esenciales del producto se consideran los efectos antimicrobianos y/o la estimulación de la defensa inmunitaria inespecífica. Los granulocitos neutrófilos se encuentran en el frente más avanzado de la defensa inmunitaria frente a agentes patógenos de enfermedades y en particular frente a bacterias. La estimulación de estos leucocitos, p.ej. en el transcurso de la fagocitosis de microorganismos, va acompañada de un consumo aumentado de oxígeno y de la formación de compuestos oxigenados altamente reactivos (p.ej. un superóxido, peróxido de hidrógeno), con cuya ayuda estas células aniquilan a los agentes patógenos de infecciones. En el caso de una reacción defensiva excesiva y en el transcurso de infecciones crónicas, las especies oxigenadas reactivas liberadas por células fagocitantes pueden producir, no obstante, también daños a los tejidos. Ciertas sustancias con unas propiedades antioxidantes pueden impedir estos efectos secundarios indeseados y con esto pueden mejorar y acelerar el proceso de curación (Cuzzocrea y colaboradores, Pharmacol. Rev. 53, 135 (2001)). Puesto que las propiedades antioxidantes son dependientes del contenido de fenoles totales, para los extractos conformes al invento resulta, por consiguiente, una superioridad inequívoca frente a los extractos de comparación.

Junto a las especies oxigenadas reactivas, las células fagocitantes aprovechan también enzimas proteolíticas, a fin de aniquilar a las bacterias. Entre las proteasas más importantes y más potentes, producidas y liberadas por los leucocitos, se cuenta la elastasa. Esta enzima tiene una importancia patofisiológica debido a su influencia destructora sobre el tejido anfitrión, y los agentes inhibidores de la elastasa tienen, por lo tanto, unas amplias aplicaciones terapéuticas en el caso de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, tal como p.ej. en los casos de una bronquitis crónica y de otras enfermedades de las vías respiratorias, de un enfisema pulmonar, de una fibrosis quística, de una artritis reumatoide, de una miocarditis, etc. (Fujie y colaboradores, Eur. J. Pharmacol., 374, 117 (1999)).

Se ha encontrado ahora, con sorpresa, que los extractos de *Pelargonium sidoides* y/o *reniforme* disponen de unas potentes actividades inhibitorias frente a la elastasa de leucocitos humanos (HLE) y que este efecto se correlaciona asimismo con el contenido de fenoles totales de los extractos. El mecanismo doble de acción a base de las propiedades antioxidantes y de la inhibición de la HLE se considera como particularmente ventajoso, puesto que influye de un modo causal sobre los dos factores patogenéticos más importantes, que contribuyen al daño para un tejido propio del cuerpo en el caso de procesos inflamatorios crónicos (Portevin y colaboradores, J. Med. Chem. 40, 1906 (1997)).

Los extractos obtenidos pueden ser elaborados en común con las sustancias coadyuvantes farmacéuticas usuales para dar unas formulaciones farmacéuticas sólidas, tales como cápsulas, tabletas, tabletas revestidas o tabletas para mascar. Como sustancias coadyuvantes farmacéuticas se utilizan usuales agentes de carga y relleno, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, así como sustancias odorantes y saboreantes y agentes de revestimiento para tabletas revestidas. Como sustancias coadyuvantes farmacéuticas para la preparación de cápsulas de gelatina blanda se utilizan aceites y

ES 2 287 322 T3

grasas usuales como masas de relleno para cápsulas de gelatina blanda. Los extractos obtenidos se pueden elaborar en común con sustancias coadyuvantes farmacéuticamente usuales para dar formulaciones farmacéuticas líquidas tales como soluciones, rociadas (sprays) y suspensiones. Como sustancias coadyuvantes farmacéuticas se utilizan usuales agentes disolventes, solubilizantes, estabilizadores así como sustancias odorantes y saboreantes.

El invento se explica con ayuda de los siguientes Ejemplos no limitativos. Con el fin de obtener unos datos analíticos y farmacológicos comparables, en todos los Ejemplos se secó para dar un extracto seco. Los extractos secos representan, no obstante, a las soluciones de los extractos que se presentan como fundamento, las cuales son asimismo un objeto del invento.

Ejemplos 1 hasta 4

Percolación con diferentes disolventes para extracción

Ejemplo 1

1 kg de raíces secadas de *Pelargonium sidoides* se hincharon previamente durante 24 h con 2 kg de EtOH al 35% en peso y luego se transfirieron a una columna de vidrio. A continuación, se percoló durante 10 h con 8 kg de un EtOH al 5% en peso, seguidamente se exprimió ligeramente el residuo de la droga, el extracto en bruto se filtró a través de un filtro Seitz Supra 1500 y se concentró por evaporación hasta sequedad.

Ejemplos 2 y 3

40 g de raíces secadas de *Pelargonium sidoides* se hincharon previamente durante 22 h con 80 g de un disolvente para extracción (un etanol al 11% en peso o respectivamente al 35% en peso) y luego se transfirieron a una columna de vidrio. A continuación, se percoló durante 3 a 4 h con 320 g del anterior disolvente para extracción, seguidamente se exprimió ligeramente el residuo de la droga y el extracto en bruto transparente se concentró por evaporación hasta sequedad.

Ejemplo 4

40 g de raíces secadas de *Pelargonium sidoides* se cargaron en una columna de vidrio y se percolaron durante 8 h con 400 g de etanol al 11% en peso. Seguidamente se exprimió ligeramente el residuo de la droga, el extracto en bruto se filtró a través de un filtro Seitz Supra 1500 y se concentró hasta sequedad.

Ejemplo n°	Disolvente para extracción % en peso de EtOH	Rendimiento (%)	Fenoles totales (%)	Cumarinas totales (%)	Potencial antioxidante µg de Trolox / mg	Inhibición de la elastasa CI ₅₀ (µg/ml)
1	11 (35 %/5%)	18,4	17,47	3,18	279	5,7
2	11	15,3	17,09	3,14	237	8,4
3	35	17,2	24,16	2,84	311	6,2
4	11	17,8	21,79	2,69	273	5,9

Ejemplo de comparación 1

Maceración según la DAB

20 g de raíces secadas de *Pelargonium sidoides* se extrajeron de modo correspondiente a la prescripción de maceración para extractos según la DAB 10 con 140 ml de un etanol al 11% en peso a la temperatura ambiente durante 5 días, mediando un sacudimiento esporádico y un almacenamiento subsiguiente durante 5 días a una temperatura fresca. A continuación, se filtró y la solución del extracto se secó.

Ejemplos 5 hasta 9 y Ejemplo de comparación 2

Maceración con diferentes disolventes para extracción

20 g de raíces secadas de *Pelargonium sidoides* se maceraron con 140 g del disolvente para extracción (una mezcla de etanol y agua en la composición indicada más abajo o respectivamente agua (Ejemplo de comparación 2)) a 50°C durante 30 minutos. A continuación, la solución del extracto se separó por filtración y el residuo de la droga se maceró una segunda vez de igual manera. Después de la separación de la modalidad de sólido/líquido (filtración), las soluciones de los extractos se reunieron y se secaron.

ES 2 287 322 T3

Ejemplo n°	Disolvente para extracción % en peso de EtOH	Rendimiento (%)	Fenoles totales (%)	Cumarinas totales (%)	Potencial antioxidante µg de Trolox / mg	Inhibición de la elastasa CI ₅₀ (µg/ml)
Comparación 1	11	8,0	12,37	3,14	211	>10
Comparación 2	0 (agua)	13,8	14,07	2,69	234	9,0
5	11	16,2	18,72	2,65	271	6,0
10	20	16,5	20,10	2,42	304	5,0
6	35	17,6	24,13	2,43	353	4,2
7	60	15,7	27,53	2,63	366	5,9
15	90	7,6	36,18	2,93	508	4,5

Métodos analíticos y farmacológicos

Determinación de los fenoles totales

La determinación de los fenoles totales se efectúa, de una manera análoga al método de la Farmacopea para sustancias curtientes (DAB 2000), fotométricamente después de haber hecho reaccionar con un reactivo de molibdato y wolframato. Para esto, el extracto se disuelve en etanol acuoso, se alcaliniza con una solución de carbonato de sodio y se mezcla con un reactivo de molibdato y wolframato. Después de una centrifugación, se mide la extinción de la solución sobrenadante a 720 nm frente a agua. El cálculo se efectúa referido a epicatecol.

Determinación de las cumarinas totales

La determinación de las cumarinas totales se efectúa por medio de una HPLC (cromatografía en fase líquida de alto rendimiento) a través de una columna de RP-18. Como fase móvil se utiliza un gradiente de mezclas de acetonitrilo, agua y ácido fosfórico (10:990:4 ⇄ 205:795:4). Se detecta en los UV (ultravioletas) a 330 nm. El cálculo de los picos individuales de cumarina se efectúa como escopoletina.

Determinación del potencial antioxidante

El procedimiento utilizado de Shi, H. y Niki, E. (Lipids 33, 365 (1998)) está basado en la medición fotométrica de la modificación de la extinción que va acompañada por la reducción de un radical estable (galvinoxilo).

Para esto, se disuelven 2,69 mg de galvinoxilo en 500 ml de etanol (12,75 µmol/l). De éstos se mezclan 8 ml con 200 µl de una muestra o respectivamente de una solución de calibración (véase más abajo) y se incuba durante 20 min a la temperatura ambiente en la oscuridad. Después de esto, se mide en un fotómetro a 428 nm.

Solución de calibración: 0,954 mg de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) se disuelven en 25 ml de una mezcla de etanol y agua 1/1. A partir de esta solución original se preparan unas diluciones a 1/25, 1/20, 1/10, 1/5 así como a 1/2 en una mezcla de etanol y agua 1/1, y se mide la absorción a 428 nm.

Determinación de la inhibición de la elastasa

La influencia de ciertos extractos sobre la actividad peptidolítica de la HLE (E.C. 3.4.21.37; de Sigma) se determinó a la temperatura ambiente en Tris-HCl 50 mM (de pH 8) con NaCl 50 mM y Brij 35 al 0,01%. La HLE (50 µl, 200 mU/ml) se incubó durante 15 minutos con 50 µl de los extractos en una placa de microtitulación. La reacción enzimática se inició a continuación mediante la adición de 50 µl del sustrato (metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilida; 1 mM, de Sigma) y se midió a lo largo de un período de tiempo de 10 minutos en un fotómetro para microplacas a 405 nm (Thermomax, de Molecular Devices). La inhibición de la actividad enzimática se calculó en comparación con un testigo con disolvente idéntico (DMSO = dimetilsulfóxido).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la preparación de un extracto de *Pelargonium sidoides* y/o *Pelargonium reniforme*, **caracterizado** porque las raíces de *Pelargonium sidoides* y/o *Pelargonium reniforme* o bien
- 10 a) se someten a una percolación con un disolvente acuoso-etanólico, el residuo de la droga se exprime eventualmente de manera ligera y el extracto en bruto se filtra eventualmente, o
- b) se someten a una maceración en dos etapas con un disolvente acuoso-etanólico, separándose por filtración después de la primera maceración la solución del extracto, y el residuo de la droga se macera una segunda vez, y las soluciones de los extractos se reúnen después de la separación de sólido / líquido.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se seca el extracto líquido obtenido en la etapa a) o b), a fin de obtener un extracto seco.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que al realizar la percolación, antes de la percolación propiamente dicha, se efectúa una maceración con un disolvente acuoso-alcohólico.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la maceración y la percolación se efectúan respectivamente con un etanol acuoso de diferente concentración.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el disolvente acuoso-etanólico es un etanol al 10-92% en peso.
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el disolvente acuoso-etanólico es un etanol al 10-60% en peso.
- 30 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la concentración media ponderada del etanol acuoso utilizado en la maceración y en la percolación está situada en el intervalo de 10-92% en peso, preferiblemente de 10-60% en peso.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que se utiliza para la maceración un etanol al 35% en peso y para la percolación un etanol al 5% en peso en la relación de 2:8.