

Título**Procedimiento de obtención de extractos de hojas de *Corema album* y su aplicación terapéutica****Objeto**

La presente invención tiene por objeto un extracto de acetato de etilo procedente de las hojas de *Corema album* (L.) D. Don (Ericaceae), con actividad citotóxica, así como a los principios activos aislados del mismo, que generan especies reactivas de oxígeno e inducen apoptosis.

La presente invención pertenece al área científica Farmacéutica, dado que establece los métodos de obtención y análisis fitoquímico de extractos de las hojas de *Corema album*, así como fracciones y principios activos aislados y su actividad citotóxica. La industria farmacéutica de productos naturales y la industria agroalimentaria son potenciales usuarios de la presente invención, que podrá aplicarse para el desarrollo de medicamentos, nutracéuticos o alimentos funcionales en el tratamiento y prevención del cáncer.

Estado de la técnica

El cáncer supone un 12.5% de las muertes en el mundo al año. A pesar de los avances médicos, la tasa de mortalidad no ha sufrido apenas variación en las últimas décadas. La cirugía y la radioterapia han demostrado ser efectivas en las primeras etapas de la aparición del tumor, pero en muchos casos éste no es detectado hasta que ya ha producido metástasis en otros órganos. Entonces, es necesario administrar por vía sistémica agentes quimioterapéuticos que, al producir numerosos efectos adversos, han de administrarse a dosis que resultan ineficaces en muchos casos. Esta ineficacia se refleja en las bajas tasas de supervivencia en pacientes con un cáncer avanzado (Jemal et al., 2011. Glob. Canc.Stat., 61(2), 69-90).

La baja eficacia de la terapia actual del cáncer en pacientes con metástasis, junto con los efectos adversos y la aparición de tumores resistentes, hace necesario el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. El uso de productos naturales es

especialmente extenso en Oncología, donde, de las 155 moléculas de bajo peso molecular aprobadas entre la década de 1940 y 2006, un 73% estaban relacionadas con productos naturales (Cragg et al., 2009. Chem. Rev. 109(7), 3012-3043).

Existe un creciente interés por los extractos vegetales como una alternativa en el tratamiento y prevención de enfermedades neoplásicas ya que en muchos casos se puede disponer de materia prima en cantidad por un menor coste y pueden tener igual o mayor eficacia a los antineoplásicos existentes.

Las chalconas constituyen un importante grupo de compuestos fenólicos que presentan una gran variedad de actividades biológicas, como antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana, citotóxica... Están de manera natural en nuestra dieta y en distintas plantas medicinales, por ejemplo, isoliquiritigenina es abundante en el regaliz, obtenido de la raíz de *Glycyrrhiza glabra*. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la capacidad de las chalconas y sus derivados para inhibir diferentes pasos del desarrollo de la carcinogénesis, y su implicación en los mecanismos de apoptosis de células transformadas y la regulación del ciclo celular, por lo que se presentan como una familia de moléculas con gran potencial en la quimioprevención y tratamiento del cáncer. Entre los mecanismos de acción de las chalconas se encuentra la interacción con los factores de transcripción NF- κ B, STAT3, AP-1, NRF2, PPAR- γ , que regulan la expresión de numerosos genes implicados en el proceso de la carcinogénesis y que forman parte de las rutas de señalización celular en estados de estrés oxidativo e inflamatorio. Además, se ha visto que las chalconas pueden prevenir la etapa de progresión tumoral mediante la activación de la apoptosis, tanto por la vía extrínseca como intrínseca, siendo la proteína antiapoptótica Bcl-2 una de las dianas más frecuentes (Yadav et al., 2011. Int Immunopharmacol, 11(3), 295-309).

Corema album, es una especie perteneciente a la familia Ericaceae, la cual también incluye especies de gran interés agroindustrial, como los arándanos (*Vaccinium sp.*). Crece en los arenales y dunas subcosteras del litoral atlántico de la Península Ibérica. En España aparece en las costas gallegas de La Coruña y Pontevedra y en Andalucía en diferentes puntos del litoral de Huelva y Cádiz. Es un arbusto dioico, de hasta 1m de altura, muy ramificado. Las ramas inferiores son glabras y con numerosas cicatrices foliares; las de los últimos años, densamente tomentosas, con pelos poco ondulados y color grisáceo. Las hojas son xeromórficas, adaptadas al clima seco y miden en torno a 5-6 x 1-2 mm. No existen datos previos publicados

acerca de la composición química o actividad farmacológica de las hojas de esta especie.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a la obtención y uso de cualquier extracto, fracción o principio activo aislado de las hojas de *Corema album* (L.) D. Don, Ericaceae, en la prevención y tratamiento de enfermedades neoplásicas; preferentemente el extracto de acetato de etilo que presenta marcada actividad citotóxica en la línea celular HT-29 procedente de adenocarcinoma de colon frente al patrón utilizado 5-fluouracilo (CI_{50} : 15.8 ± 2.6 y 16.2 ± 2.6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

La actividad citotóxica mostrada por el extracto en la línea celular HT-29 procedente de adenocarcinoma de colon, se mantiene en las fracciones y los compuestos aislados, 2',4'-dihydroxidihydrochalcona (CI_{50} : 1.8 ± 0.4 μM), 2'-metoxi-4'-hidroxidihydrochalcona (CI_{50} : 8.5 ± 2.1 μM) y fracción de pinocembrina y 2',4'-dihydrochalcona (CI_{50} : 6.8 ± 1.2 $\mu\text{g/mL}$) frente al patrón de 5-fluorouracilo (CI_{50} : 8.7 ± 4.0 μM , 16.2 ± 2.6 $\mu\text{g/mL}$). Por tanto, el extracto, fracciones o los compuestos podrían ser empleados en la terapia antitumoral.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un extracto de las hojas de *Corema album* caracterizado porque se identifican los principios activos 2',4'-dihydroxidihydrochalcona, 2'-metoxi-4'-hidroxidihydrochalcona, pinocembrina, 2',4'-dihydrochalcona, ácido ursólico y ácido oleanólico que presentan actividad citotóxica y esta actividad es debida a que generan apoptosis y una parada en el ciclo celular en la fase G2/M.

Un segundo aspecto de la presente invención, se refiere a la obtención del extracto que se describe anteriormente, obtenido usando un procedimiento de extracción que comprende los pasos:

- a) Desecar las hojas de *Corema album* a temperatura ambiente
- b) Añadir entre 1 y 10 volúmenes de acetato de etilo u otro disolvente orgánico (p.ej. acetona, hexano, etanol, metanol) o mezcla de solventes a las hojas desecadas
- c) Extraer entre 30 y 120 minutos a temperatura ambiente en baño de ultrasonido. El proceso extractivo descrito puede repetirse si fuese necesario a fin de aumentar el rendimiento. También puede ser extraído por

maceración, percolación o extracción continua.

- d) Finalmente filtrar y concentrar a presión reducida en rotavapor para obtener un extracto seco.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al fraccionamiento y análisis de dicho extracto, caracterizado por la cromatografía del extracto en columna de sílice utilizando como eluyente n-hexano y acetato de etilo en diferentes gradientes. Las fracciones obtenidas fueron agrupadas de acuerdo a su comportamiento cromatográfico (Ver Tabla 1).

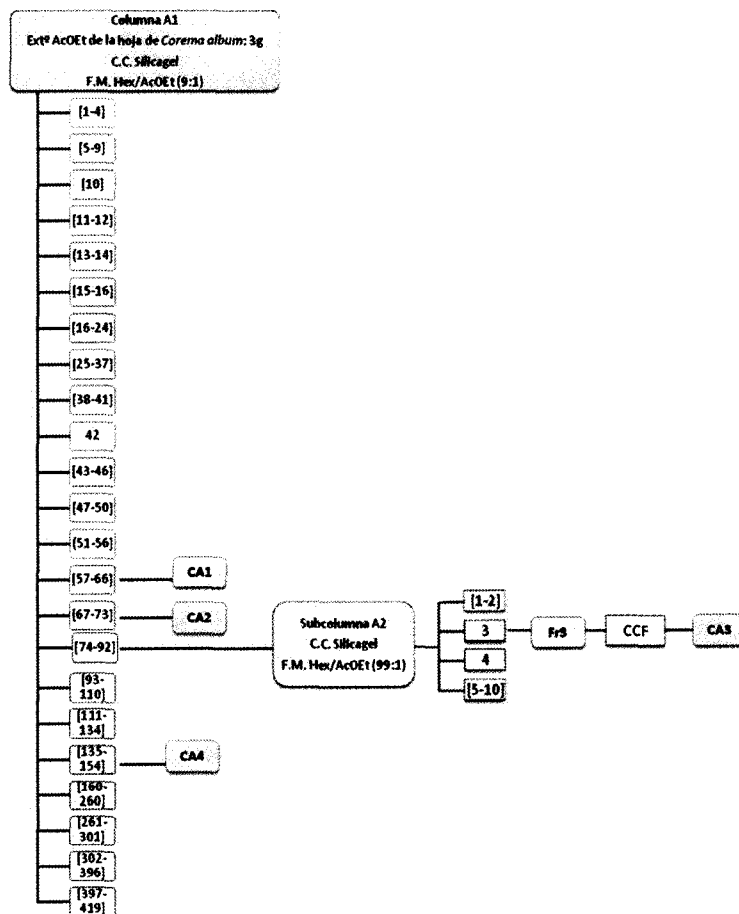


Tabla 1. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo de la hoja de Corema album. CA1: 2',4'-dihidroxi-dihidrochalcona; CA2: 2'-metoxi-4'-hidroxidihidrochalcona; CA3: pinocembrina; CA4: 2',4'-dihidrochalcona.

La composición de las fracciones de mayor contenido en compuestos fenólicos es determinada empleando diferentes técnicas analíticas, incluyendo espectrometría de

masas y resonancia magnética nuclear.

Por último, el extracto de las hojas de *Corema album*, sus fracciones o principios activos aislados del mismo podrán administrarse en forma de preparado medicamentoso caracterizado por actividad citotóxica. La formulación de los preparados medicamentosos podrá hacerse siguiendo cualquiera de los procedimientos convencionales, pudiendo presentarse en forma de polvo, papeles, granulado, cápsula, sello, pastilla, comprimido, tableta, solución, jarabe, suspensión, tintura o cualquier otra forma farmacéutica. Los preparados farmacéuticos que contengan extractos de hojas de *Corema album* podrán formularse con diferentes vehículos, excipientes y diluyentes a fin de optimizar la administración del mismo por la vía deseada.

Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Modo de realización de la invención

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Ejemplo 1: Obtención del extracto, fraccionamiento y análisis químico.

Las hojas de Corema album (L.) D. Don fueron recolectadas en el mes de septiembre en la provincia de Huelva. Tras desecarlas a temperatura ambiente, 500 g de hojas fueron sometidas a un proceso de extracción en baño ultrasonido. Se añadieron 1000 mL de acetato de etilo a las hojas desecadas sin triturar y se extrajeron durante 45 minutos a temperatura menor de 40°C en un baño de ultrasonido. Posteriormente se filtró el extracto resultante y se concentró hasta sequedad a presión reducida en rotavapor.

Este extracto se cromatografió en columna de sílice utilizando como eluyente n-hexano y acetato de etilo en diferentes gradientes. Las 419 fracciones de 15 mL obtenidas, fueron agrupadas de acuerdo a su comportamiento cromatográfico (Figura 1), siendo reveladas a la luz UV y con los reactivos óleum y AlCl₃.

De la reunión de las fracciones [57-66], se aisló por cristalización en metanol un

compuesto en forma de agujas de color amarillo, que fue identificado como 2',4'-dihidroxi-dihidrochalcona.

De las fracciones agrupadas [67-73], se cristalizó en metanol un compuesto en forma de agujas blancas, que fue identificado pinocembrina.

Reunidas las fracciones [74-92], 500 mg se sometieron nuevamente a una subcolumna de silicagel (Columna A2). La fracción 3 (Fr3), que cristalizó en forma de agujas amarillas. Mediante cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS/MS), se conoció la proporción de la mezcla de dos compuestos: pinocembrina y 2',4'-dihidrochalcona (4:6).

De la reunión de las fracciones [135-154], cristalizó en metanol un compuesto como agujas blancas, que identificamos como 2'-metoxi-4'-hidroxi-dihidrochalcona.

Todas las sustancias aisladas fueron caracterizadas por sus espectros de masas y RMN. Su determinación estructural se realizó fundamentalmente en base a la aplicación de diversas experiencias de RMN (COSY, NOESY, HSQC y HMBC), habiéndose asignado todas las señales que aparecen en sus espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

Ejemplo 2: Determinación de la actividad citotóxica

La actividad citotóxica del extracto de acetato de etilo de las hojas de *Corema album* y los compuestos aislados e identificados fue evaluada por la técnica de la Sulforhodamina B (SRB), presentando un perfil citotóxico similar al del patrón 5-fluorouracilo.

Se siguieron los protocolos establecidos por el NCI, (Monks et al., J. Natl. Cancer Inst. 1991, 83, 757). La línea celular HT-29 de adenocarcinoma de colon fue cultivada en medio RPMI 1640 (Bio Whittaker) que contenía 20% suero bovino fetal, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. El ensayo de citotoxicidad fue realizado utilizando placas de 96 pocillos. Todas las células fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ con 95% de humedad. Las células fueron subcultivadas semanalmente, y el medio de cultivo era renovado dos veces por semana.

Los compuestos fueron disueltos inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO), y se prepararon 5 diluciones seriadas logarítmicamente en medio RPMI (Roswell Park

Memorial Institute medium). La concentración final de DMSO nunca fue superior al 0.6%, para evitar la citotoxicidad debida a este disolvente. La dosis máxima ensayada fue de 10^{-4} M para los compuestos puros. Los compuestos no fueron filtrados ni esterilizados ya que la contaminación microbiana se controló por adición de gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al medio. A continuación, se añadió a cada pocillo de las placas incubadas anteriormente, las diferentes disoluciones de los extractos o compuestos puros (100 μL). Posteriormente se incubaron durante 48 h a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5%.

El ensayo de Sulforhodamina B (SRB) fue utilizado en este estudio para determinar la inhibición del crecimiento. Este ensayo colorimétrico estima el número de células de forma indirecta tiñendo las proteínas totales celulares con el colorante SRB.

Las células tumorales fueron fijadas por la adición de 50 μL de ácido tricloroacético frío al 50%, incubándose a 4°C durante una hora. A continuación, las placas se lavaron 5 veces con agua desionizada y se dejaron secar. Posteriormente se adicionó a cada pocillo 100 μL de solución de SRB (0.4% p/v en ácido acético al 1%), incubándose 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron las placas 5 veces con ácido acético glacial al 1% y se dejaron secar. Finalmente las células se solubilizaron en 100 μL de tampón Tris 10 mM, se agitó 5-10 minutos y se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro automático de placa. De forma paralela a este ensayo se realizó una placa control, en la que se realizó esta técnica del SRB una vez realizada la primera incubación.

Finalmente, se calcularon los valores de CI_{50} concentración de extracto o compuesto que produce una inhibición de crecimiento del 50% respecto al control, Tres experimentos diferentes fueron realizados para cada extracto o compuesto. Los datos fueron dados como media de dos o tres experimentos \pm SEM.

Los resultados obtenidos de actividad citotóxica, de los extractos, fracciones y compuestos aislados, se recogen en la siguiente tabla:

	IC ₅₀ (µg/mL)
Extracto AcOEt hojas <i>Corema album</i>	15,8 ± 2,6 µg/mL
2',4'-dihidroxi-dihidrochalcona	0,44 ± 0,1 µg/mL
2'-metoxi-4'-hidroxidi-hidrochalcona	1,8 ± 0,5 µg/mL
Fracción de pinocembrina y 2',4'-dihidrochalcona	6.8 ± 1.2 µg/mL
Patrón 5-fluorouracilo	16.2 ± 2.6 µg/mL

Tabla 2: Resultados del ensayo de citotoxicidad (µg/ml) realizado con el extracto, fracción y compuestos aislados de *Corema album* y el fármaco patrón 5-fluorouracilo.

La incubación con agentes antioxidantes, simultáneamente con tratamiento, disminuyó la citotoxicidad de los compuestos ensayados, lo que puso de manifiesto la implicación de la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el mecanismo de citotoxicidad de 2',4'-dihidroxi-dihidrochalcona y 2'-metoxi-4'-hidroxidi-hidrochalcona (Figura 1).

La capacidad de la fracción compuesta por 2',4'-dihidroxi-dihidrochalcona y pinocembrina para inducir apoptosis fue evaluada mediante un kit de Anexina-V unida a isotiocianato de fluoresceína (Anexina V-FITC). Para ello, sembramos 50.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos con un volumen final de 2 mL, e incubamos una noche a 37 °C y 5% de CO₂. Al día siguiente tratamos con 0, 6 y 12 µg/mL de fracción, e incubamos en las mismas condiciones durante 48 horas.

Transcurrido el tiempo de tratamiento, recogimos el medio con células en suspensión, lavamos los pocillos dos veces con tampón fosfato salino (PBS), y recolectamos las células, que estaban adheridas, por tripsinización. Combinamos estas células con las anteriores, centrifugamos y resuspendimos el *pellet* con medio completo. Tras incubar las células durante 30 minutos a 37 °C y 5% de CO₂, centrifugamos y resuspendimos el *pellet* en tampón 1x de Anexina V. A continuación, incubamos 10 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo unido a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Por último se añadió el ioduro de propidio (IP) a

4 °C.

El análisis se realizó en un citómetro de flujo, midiendo la fluorescencia de la suspensión de células con una longitud de onda de excitación de 488 nm, y registrando la emisión de la fluorescencia verde (518 nm) del FITC y la roja (620 nm) del IP. (Figura 2)

El análisis del ciclo celular se realizó por medio del marcaje por fluorescencia de los núcleos de las células en suspensión con yoduro de propidio (IP), y el posterior análisis del contenido de ADN nuclear de cada célula de la población, mediante citometría de flujo. (Núñez, 2001, Curr issues Mol Biol. 3(3), 67-70). Sembramos 50.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos con un volumen final de 2 mL incubamos una noche a 37 °C y 5% de CO₂. Al día siguiente, tratamos con 0, 6 y 12 µg/mL de fracción e incubamos en las mismas condiciones 48 horas.

Transcurrido ese tiempo, recogimos el medio con células en suspensión, lavamos los pocillos dos veces con tampón PBS, y recolectamos las células que estaban adheridas por tripsinización. Combinamos estas células con las anteriores, centrifugamos y resuspendimos el *pellet* en 2 mL de EtOH al 70%. Tras incubar a 4 °C durante 72 horas, se centrifugó y se resuspendió el *pellet* en una solución que contiene IP y ARNasa A, disueltos en PBS. Se incubó una noche a 4 °C y se analizó al día siguiente en un citómetro de flujo, midiendo la fluorescencia de la suspensión de células con una longitud de onda de excitación de 488nm y registrando la emisión de la fluorescencia roja (620nm) del IP (Figura 3).

Descripción del contenido de las figuras

Figura 1. Efecto de los agentes antioxidantes N-acetilcisteína (NAC) y pentacloruro de Manganeso (III) tetrakis (1-metil-4-piridil) porfirina (MnTMPyP) sobre la actividad citotóxica de los flavonoides: 2'-4'-dihydroxidihydrochalcona y 2'-metoxi-4'-hidroxidihydrochalcona. Tras 48 horas de exposición, la viabilidad celular fue determinada mediante el test de SRB. Los resultados se expresan como ($M \pm \delta$, n=3). (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, vs. Control, por t de Student).

Figura 2. Porcentaje de células en apoptosis al tratar las líneas HT-29 con 0 (control), 6 y 12 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción Fr3, aislada de las hojas de Corema album, durante 48 horas. Los resultados se expresan como ($M \pm \delta^2$, n=3). (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, vs. Control, por t de Student)

Figura 3. Porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular al tratar las células HT-29 con 0 (control), 6 y 12 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción Fr3, aislada de las hojas de Corema album, durante 48 horas. Los resultados se expresan como ($M \pm \delta^2$, n=3). (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, vs. Control, por t de Student).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un extracto de las hojas de *Corema album* (L.) D., caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - a) Desecar las hojas de *Corema album* a temperatura ambiente
 - b) Añadir entre 1 y 20 volúmenes de acetato de etilo u otro disolvente orgánico o mezcla de disolventes a las hojas desecadas.
 - c) Extraer entre 30 y 120 minutos a temperatura ambiente en baño de ultrasonido. El proceso extractivo descrito puede repetirse si fuese necesario a fin de aumentar el rendimiento.
 - d) Finalmente filtrar y concentrar a presión reducida en rotavapor para obtener un extracto seco.
2. Procedimiento de obtención de un extracto de las hojas de *Corema album* (L.) D., según reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa c) la extracción se hace por maceración o percolación o extracción continua.
3. Procedimiento de obtención de un extracto de las hojas de *Corema album* (L.) D., según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el extracto de *Corema album* puede ser fraccionado cromatográficamente, manteniendo las fracciones su actividad citotóxica porque contenga algunos de los principios activos
4. Extracto de hojas de *Corema album* (L.) D. obtenido por el procedimiento descrito en las reivindicaciones anteriores, caracterizado por contener los compuestos activos 2',4'-dihydroxidihydrochalcona, pinocembrina, 2',4'-dihydroxichalcona, 2'-metoxi-4'-hidroxidihydrochalcona.
5. Uso del extracto de hojas de *Corema album* (L.) D., según reivindicaciones anteriores, en la preparación de un medicamento con actividad citotóxica, preferentemente en la línea HT-29 de adenocarcinoma de colon humano.
6. Uso del extracto de hojas de *Corema album* (L.) D., según reivindicaciones anteriores, en la preparación de un medicamento para la quimioprevención y el tratamiento del cáncer.

FIGURAS

Figura 1.

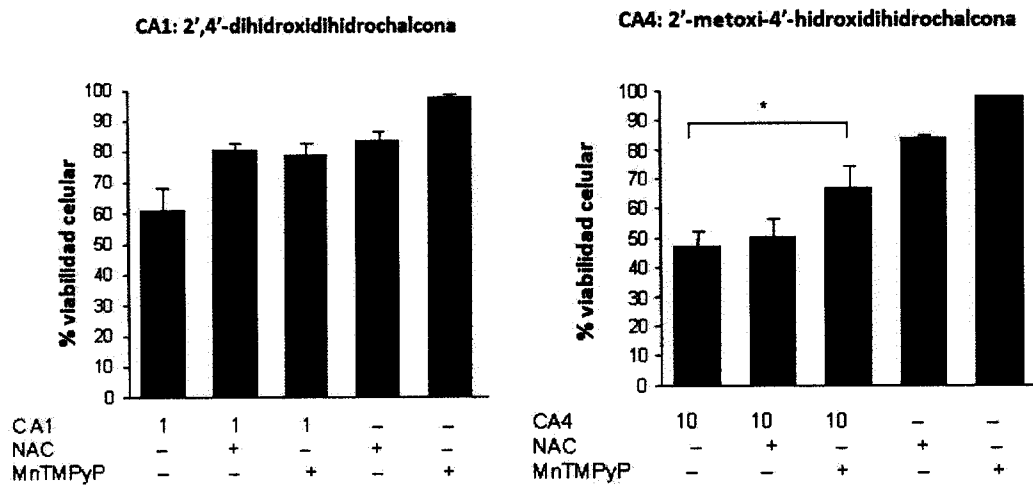


Figura 2.

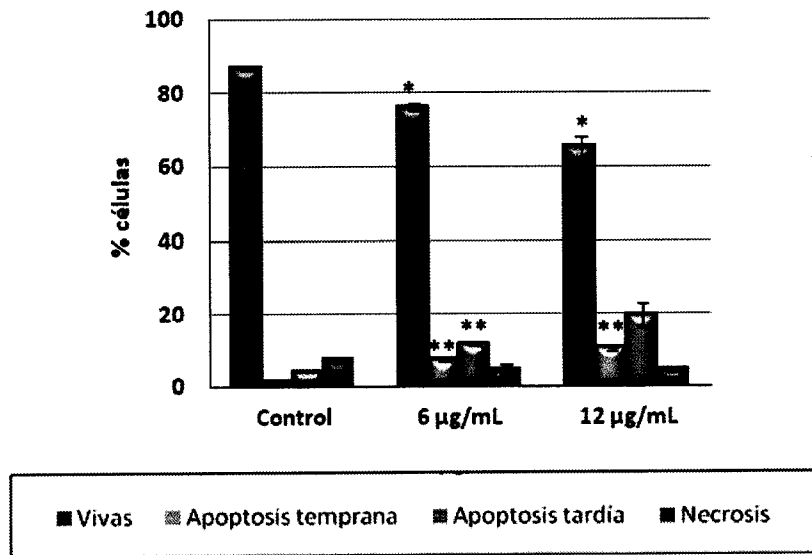
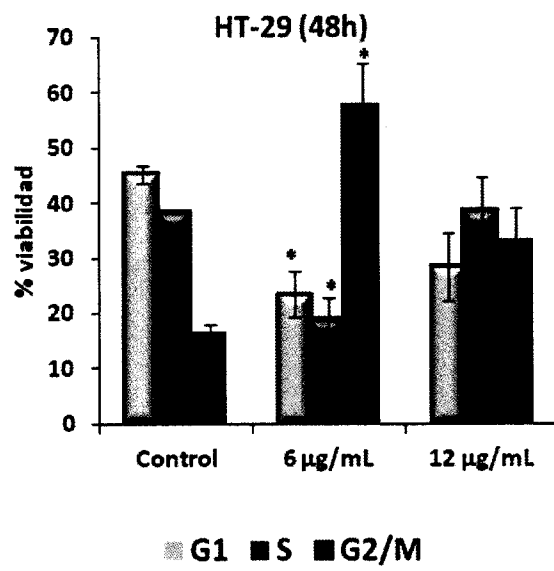


Figura 3.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/000099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, X-FULL, NPL, CAPLUS, FSTA, PASCAL, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEÓN-GONZÁLEZ, A. J. et al. Chemo-protective activity and characterization of phenolic extracts from <i>Corema album</i> . Food Research International, 2012, Vol. 49, nº 2, pages 728-738. ISSN 0963-9969. Doi:10.1016/j.foodres.2012.09.016	1, 2
A	LEÓN-GONZÁLEZ, A. J. et al. Phenolic acids, flavonol and anthocyanins in <i>Corema album</i> (L.) D. Don berries. Journal of Food Composition and Analysis, February 2013, vol. 29, nº 1, pages 58-63. ISSN 0889-1575. Doi:10.1016/j.jfca.2012.10.003	1
A	FOREJTNIKOVA, H. et al. Chemoprotective and toxic potentials of synthetic and natural chalcones and dihydrochalcones in vitro. Toxicology, 2005. Vol. 208, nº 1, pages 81-93. ISSN 0300-483X. Doi: 10.1016/j.tox.2004.11.011	4 - 6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
1 October 2014 (01.10.2014)

Date of mailing of the international search report
(02/10/2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

A. Sukhwani

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495473

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/ES2014/000099

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ES 2244075 T3 (INDENA S.P.A) 01.12.2005, page 2, claims 1, 4-6	4 - 6
A	ES 2181806 T3 (INDENA S.P.A.) 01.03.2003, page 2	4 - 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2014/000099

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2244075T T3	01.12.2005	US6423740 B1 HK1023770 A1 NO996287 A NO314802B B1 US6147082 A SK179599 A3 SK283077B B6 SI0989973T T1 RU2203883 C2 PT989973E E PL337361 A1 PL190495B B1 KR20010013603 A JP2002506439 A JP4064471B B2 HU0003068 A2 HU0003068 A3 WO9858913 A1 EP0989973 A1 EP0989973 B1 DK0989973T T3 DE69831409T T2 CZ9904599 A3 CZ294976 B6 CN1261349 A CN1198802C C CA2294278 A1 CA2294278 C AU8537598 A AU742784B B2 AU742784C C AT303362T T	23.07.2002 21.10.2005 21.02.2000 26.05.2003 14.11.2000 12.06.2000 04.02.2003 28.02.2006 10.05.2003 30.11.2005 14.08.2000 30.12.2005 26.02.2001 26.02.2002 19.03.2008 29.01.2001 28.02.2002 30.12.1998 05.04.2000 31.08.2005 17.10.2005 08.06.2006 17.05.2000 13.04.2005 26.07.2000 27.04.2005 30.12.1998 25.09.2007 04.01.1999 10.01.2002 18.08.2005 15.09.2005
----- ES2181806T T3	----- 01.03.2003	----- JP2004131509 A NO972842 A NO307926B B1 KR100264369B B1 FI972641 A US5808137 A SK78197 A3 SK282259B B6 SI9520139 A SI9520139 B RU2181284 C2 PT800387E E PL320787 A1 PL183772B B1 HU225501 B1 HUT77438 A WO9619209 A1	----- 30.04.2004 19.06.1997 19.06.2000 16.08.2000 14.08.1997 15.09.1998 10.12.1997 03.12.2001 31.10.1997 28.02.1999 20.04.2002 31.12.2002 27.10.1997 31.07.2002 28.04.1998 28.04.1998 27.06.1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2014/000099

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP0800387 A1	15.10.1997
		EP0800387 B1	28.08.2002
		DK0800387T T3	23.12.2002
		DE69527980T T2	28.05.2003
		CZ9701869 A3	12.11.1997
		CZ288043 B6	11.04.2001
		CN1170362 A	14.01.1998
		CN1087609C C	17.07.2002
		CA2208351 A1	27.06.1996
		CA2208351 C	25.06.2002
		AU4301996 A	10.07.1996
		AU689357B B2	26.03.1998
		AT222756T T	15.09.2002
		ITMI942568 A1	20.06.1996
		IT1271301 B	27.05.1997

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K36/45 (2006.01)
A61K31/121 (2006.01)
A61K31/353 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/000099

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, X-FULL, NPL, CAPLUS, FSTA, PASCAL, SCISEARCH

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	LEÓN-GONZÁLEZ, A. J. et al. Chemo-protective activity and characterization of phenolic extracts from <i>Corema album</i> . Food Research International, 2012, Vol. 49, nº 2, páginas 728-738. ISSN 0963-9969. Doi:10.1016/j.foodres.2012.09.016	1, 2
A	LEÓN-GONZÁLEZ, A. J. et al. Phenolic acids, flavonol and anthocyanins in <i>Corema album</i> (L.) D. Don berries. Journal of Food Composition and Analysis, Febrero 2013, vol. 29, nº 1, páginas 58-63. ISSN 0889-1575. Doi:10.1016/j.jfca.2012.10.003	1
A	FOREJTNIKOVA, H. et al. Chemoprotective and toxic potentials of synthetic and natural chalcones and dihydrochalcones in vitro. Toxicology, 2005. Vol. 208, nº 1, páginas 81-93. ISSN 0300-483X. Doi: 10.1016/j.tox.2004.11.011	4 - 6

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
1 Octubre 2014 (01.10.2014)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
02-OCTUBRE-2014 (02/10/2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
A. Sukhwani
Nº de teléfono 91 3495473

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/000099

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	ES 2244075 T3 (INDENA S.p.A) 01.12.2005, página 2, reivindicaciones 1, 4-6	4 - 6
A	ES 2181806 T3 (INDENA S.p.A.) 01.03.2003, página 2	4 - 6

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2014/000099

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2244075T T3	01.12.2005	US6423740 B1	23.07.2002
		HK1023770 A1	21.10.2005
		NO996287 A	21.02.2000
		NO314802B B1	26.05.2003
		US6147082 A	14.11.2000
		SK179599 A3	12.06.2000
		SK283077B B6	04.02.2003
		SI0989973T T1	28.02.2006
		RU2203883 C2	10.05.2003
		PT989973E E	30.11.2005
		PL337361 A1	14.08.2000
		PL190495B B1	30.12.2005
		KR20010013603 A	26.02.2001
		JP2002506439 A	26.02.2002
		JP4064471B B2	19.03.2008
		HU0003068 A2	29.01.2001
		HU0003068 A3	28.02.2002
		WO9858913 A1	30.12.1998
		EP0989973 A1	05.04.2000
		EP0989973 B1	31.08.2005
		DK0989973T T3	17.10.2005
		DE69831409T T2	08.06.2006
		CZ9904599 A3	17.05.2000
		CZ294976 B6	13.04.2005
		CN1261349 A	26.07.2000
		CN1198802C C	27.04.2005
		CA2294278 A1	30.12.1998
		CA2294278 C	25.09.2007
		AU8537598 A	04.01.1999
		AU742784B B2	10.01.2002
		AU742784C C	18.08.2005
		AT303362T T	15.09.2005
-----	-----	-----	-----
ES2181806T T3	01.03.2003	JP2004131509 A	30.04.2004
		NO972842 A	19.06.1997
		NO307926B B1	19.06.2000
		KR100264369B B1	16.08.2000
		FI972641 A	14.08.1997
		US5808137 A	15.09.1998
		SK78197 A3	10.12.1997
		SK282259B B6	03.12.2001
		SI9520139 A	31.10.1997
		SI9520139 B	28.02.1999
		RU2181284 C2	20.04.2002
		PT800387E E	31.12.2002
		PL320787 A1	27.10.1997
		PL183772B B1	31.07.2002
		HU225501 B1	28.04.1998
		HUT77438 A	28.04.1998
WO9619209 A1	27.06.1996		

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2014/000099

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		EP0800387 A1	15.10.1997
		EP0800387 B1	28.08.2002
		DK0800387T T3	23.12.2002
		DE69527980T T2	28.05.2003
		CZ9701869 A3	12.11.1997
		CZ288043 B6	11.04.2001
		CN1170362 A	14.01.1998
		CN1087609C C	17.07.2002
		CA2208351 A1	27.06.1996
		CA2208351 C	25.06.2002
		AU4301996 A	10.07.1996
		AU689357B B2	26.03.1998
		AT222756T T	15.09.2002
		ITMI942568 A1	20.06.1996
		IT1271301 B	27.05.1997
<hr/>			

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K36/45 (2006.01)
A61K31/121 (2006.01)
A61K31/353 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)