

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 275**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

A61P 25/36 (2006.01)

A61K 36/81 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 25/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2017** **PCT/EP2017/058398**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017** **WO17174787**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2017** **E 17716853 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2023** **EP 3439680**

54 Título: **Extracto de hojas de tabaco y uso para el tratamiento de la adicción al tabaco**

30 Prioridad:

07.04.2016 FR 1653079

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.06.2024

73 Titular/es:

NFL BIOSCIENCES (100.0%)

199 rue Hélène Boucher

34170 Castelnau-le-Lez, FR

72 Inventor/es:

LAFONT, BRUNO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 971 275 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

Extracto de hojas de tabaco y uso para el tratamiento de la adicción al tabaco

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un extracto de hojas de tabaco, así como a una composición farmacéutica que contiene este extracto de hojas de tabaco, y a su uso en el tratamiento de la adicción al tabaco, tal como se define en las reivindicaciones.

10 TÉCNICA ANTERIOR

De manera general, la dependencia o adicción se ha definido por la Organización Mundial de la Salud como «un síndrome para el que el consumo de un producto se convierte en una exigencia mayor que otras conductas que antes tenían mayor importancia. En su forma extrema, el estado de dependencia se caracteriza por una necesidad irresistible de un producto que empuja al individuo que sufre esta dependencia a buscar impulsivamente ese producto».

La dependencia al tabaco provoca importantes problemas de salud pública, siendo muchas las enfermedades relacionadas con el tabaquismo tales como el cáncer (de pulmón, garganta, boca, labios, etc.), las enfermedades cardiovasculares, la bronquitis crónica, etc. Además, más allá de las enfermedades propiamente dichas, el tabaquismo conlleva numerosos efectos secundarios (disminución de la fertilidad, alteración de la epidermis, alteración de la mucosa bucal y nasal, alteración de las arterias cerebrales, daños en el esófago, en el estómago, deficiencias de vitaminas B y C, etc.).

Existen tres tipos de dependencia al tabaco que actúan de forma concomitante: la dependencia física, que se debe esencialmente a la presencia de nicotina en el tabaco y que se traduce en una sensación de abstinencia (fuerte deseo de fumar, irritabilidad, nerviosismo, agitación, ansiedad, alteraciones del sueño, etc.) ; la dependencia psicológica que está ligada a los efectos psicoactivos de la nicotina que proporciona placer, relajación, estimulación intelectual, acción ansiolítica, antidepresiva y supresora del apetito; y la dependencia ambiental o conductual que depende de la presión social y convivencial. La dependencia física desaparece en promedio en unas pocas semanas. Los síntomas de abstinencia alcanzan su punto máximo alrededor de tres o cuatro días después de dejar de fumar y pueden durar algunas semanas. La dependencia psicológica es más larga en desaparecer y puede durar varios meses.

La dependencia al tabaco se mantiene mediante refuerzos positivos y negativos. La nicotina es al origen de la liberación de dopamina, un neurotransmisor del circuito de la recompensa. El fumador fuma tanto para reproducir las sensaciones de placer provocadas por la liberación de dopamina (este es el refuerzo positivo de los cigarrillos) como para evitar los síntomas de abstinencia cuando su nivel de dopamina es demasiado bajo (este es el refuerzo negativo de los cigarrillos).

Existen tres métodos principales de tratamiento farmacológico de la dependencia al tabaco. El primero tiene como objetivo el cese inmediato a partir de una fecha de suspensión fijada inicialmente, se administran entonces tratamientos farmacológicos después de esta fecha de suspensión fijada en el caso de los sustitutos de la nicotina y una semana antes en el caso de bupropión o de la vareniclina (con el fin de alcanzar una concentración plasmática suficiente en la fecha de finalización fijada). La segunda consiste en reducir su consumo antes de intentar suspenderlo, la fase de reducción corresponde entonces a un pretratamiento durante el cual se administran tratamientos farmacológicos. El tercero es el de prevenir las recaídas después de dejar de fumar con éxito. A estos tres métodos se suma la reducción del consumo sin intentar buscar a llevar a cabo una tentativa de dejar de fumar.

La eficacia de cada uno de estos métodos se ve reforzada por una fase de preparación del fumador que debe convencerse de la necesidad de dejar de fumar y reforzar su motivación para conseguirlo. Las instrucciones para los tratamientos farmacológicos para la dependencia al tabaco indican así que los tratamientos de abstinencia tienen más probabilidades de tener éxito en pacientes motivados para dejar de fumar.

Actualmente existen cuatro tipos principales de tratamiento para la dependencia al tabaco (sin olvidar las psicoterapias conductuales, la acupuntura o la hipnosis), que son los sustitutos de la nicotina, el bupropión, la vareniclina y la homeopatía. El principio de acción de cada uno de estos cuatro métodos se basa en el hecho de que la nicotina es la molécula responsable del mecanismo de dependencia al tabaco.

Los sustitutos de la nicotina se pueden administrar de varias formas: por vía transdérmica en forma de parches o sellos, por vía oral en forma de chicles, pastillas o comprimidos sublinguales, o por vía aérea en forma de inhalador. La administración de sustitutos de la nicotina permite principalmente reducir los refuerzos negativos de los cigarrillos evitando en la medida de lo posible que el fumador sienta síntomas de abstinencia relacionados con la abstinencia, compensando la nicotina aportada por los sustitutos la de los cigarrillos. La eficacia de los sustitutos de la nicotina varía según el método utilizado, siendo la tasa de abstinencia generalmente comprendida entre 15 y 20 %. Los sustitutos de la nicotina se utilizan durante los intentos inmediatos de dejar de fumar y también como tratamiento previo antes de intentar dejar de fumar para ayudar a los fumadores a reducir su consumo de cigarrillos en el ámbito de dejar

de fumar gradualmente (reducir para dejar de fumar). También pueden utilizarse únicamente con el objetivo de reducir el consumo de tabaco. Aún no se ha demostrado su eficacia en el ámbito de prevención de recaídas.

El bupropión comercializado por los laboratorios GlaxoSmithKline (bajo el nombre comercial Zyban®), actúa sobre determinados neurotransmisores cerebrales como las catecolaminas, la norepinefrina y la dopamina. El bupropión es un inhibidor selectivo de la recaptación neuronal de catecolaminas, lo que le confiere propiedades antidepresivas. Su eficacia es equivalente a la obtenida después del uso de parches de nicotina (tasa de abstinencia alrededor de 20 %). Se prescribe menos que los sustitutos de la nicotina ya que tiene una relación beneficio/riesgo menos bueno para una eficacia comparable. En efecto, puede conducir a intentos de suicidio.

La vareniclina comercializada por los laboratorios Pfizer (bajo el nombre comercial Chantix® o Champix®) es un agonista parcial de los receptores nicotínicos de acetilcolina. La vareniclina se dirige a estos receptores con una doble acción: agonista parcial de los receptores $\alpha 4\beta 2$, genera una reacción similar a la inducida por la nicotina con una menor intensidad (y por lo tanto reduce los efectos de la abstinencia durante la abstinencia) y al inicio del tratamiento cuando el fumador está siendo tratado mientras se fuma ocasionalmente, atenúa la estimulación neuroquímica en presencia de nicotina (antagonista parcial de los receptores $\alpha 4\beta 2$). Por lo tanto, la vareniclina reduce los refuerzos negativos (efecto de abstinencia) y positivos (deseo de fumar) de los cigarrillos. En la práctica, la vareniclina reduce el placer de fumar, lo que sería un criterio para el éxito futuro para dejar de fumar. Su eficacia es mayor que la de los sustitutos de la nicotina (tasa de abstinencia de alrededor de 28 %). La vareniclina se utiliza durante los intentos inmediatos de dejar de fumar y también como tratamiento previo durante algunas semanas antes de intentar dejar de fumar para ayudar a los fumadores a reducir su consumo de cigarrillos en el ámbito de dejar de fumar gradualmente (reducir para dejar de fumar). En un primer estudio (NCT00789074), el 35 % de los fumadores consiguen reducir su consumo de cigarrillos al menos en un 50 %, según un punto hecho después de 3 semanas de tratamiento previo con vareniclina. En un segundo estudio (NCT00835900), el porcentaje de reducción del número de cigarrillos fumados según un punto hecho a las 4 semanas de pretratamiento con vareniclina es de 42 %. En un tercer estudio (NCT01370356), el 47 % de los fumadores consiguen reducir su consumo de cigarrillos al menos en un 50 %, según un punto hecho después de 4 semanas de tratamiento previo con vareniclina. No se ha demostrado su eficacia en el ámbito de prevención de recaídas. Por otro lado, la vareniclina provoca frecuentes efectos secundarios (náuseas) y puede ser al origen de problemas cardíacos o de intentos de suicidio. Estos efectos secundarios significan que, a pesar de su mayor eficacia que los sustitutos de la nicotina, la vareniclina a menudo se prescribe sólo como segunda línea después de un fracaso con los sustitutos de la nicotina.

La cuarta vía de abstinencia es la homeopatía que se basa en el uso de dosis infinitesimales de la sustancia que provoca los síntomas que se desean combatir. Un extracto de "tabacum" se utiliza a menudo para dejar de fumar. La solicitud de patente irlandesa IE 960 511 describe en particular el uso de diluciones homeopáticas de extracto de tabaco para la fabricación de un medicamento destinado a restablecer las funciones neuronales y al alivio de los síntomas de abstinencia de la nicotina. Al igual que las otras técnicas no convencionales de abstinencia, su eficacia no es suficiente para los grandes fumadores.

A pesar de la numerosas investigaciones en este campo, todavía existe la necesidad de encontrar nuevos tratamientos o mejorar los tratamientos existentes que permiten tratar la dependencia al tabaco.

En la solicitud PCT/FR2007/000786, la solicitante ha descubierto que inyectar a un fumador una disolución acuosa de extracto de hojas de tabaco permitía tratar la dependencia al tabaco de dicho fumador. Este descubrimiento fue realmente inesperado ya que la solicitante pudo determinar que dicho extracto acuoso de hojas de tabaco contenía pequeñas cantidades de nicotina. Así, el mecanismo de acción implicado en el tratamiento de la dependencia al tabaco con la ayuda de este extracto acuoso de hojas de tabaco no es el suministro de nicotina al fumador.

Sin embargo, el hecho de que dicho extracto acuoso de hojas de tabaco contuviera pequeñas cantidades de nicotina no aportaba ninguna información sobre su composición y su modo de fabricación. El contenido de nicotina de los extractos acuosos de hojas de tabaco puede variar en efecto considerablemente en función de muchos factores.

El contenido de nicotina en las hojas de tabaco puede así variar de 0,5 al 8 % para los principales tipos de tabaco cultivados (Davis et al., "Production, Chemistry, and Technology", ISBN-13: 978-0632047918, Capítulo 8, página 275).

El tabaco Burley contiene así aproximadamente 2 veces más nicotina que el tabaco Maryland y 3 veces más nicotina que el tabaco Oriental (Leffingwell, "Chemical constituents of tabaco leaf and Differences Among Totabacos", Leffingwell Reports, Vol.1 (No. 2), febrero, 2001).

El uso de fertilizantes nitrogenados influye en el contenido de nicotina de las hojas de tabaco y el contenido de nicotina es mayor en las hojas de la capa superior que en las de la capa intermedia, que a su vez es mayor que en las de la capa inferior (Xiao-Tang et al., "Yield and nicotine content of flue-cured tobacco as affected by soil nitrogen mineralization", Pedosphere 18(2): 227-235, 2008, ISSN 1002-0160/CN 32-1315/P).

La rotación de cultivos influye en el contenido de nicotina de las hojas de tabaco (Butorac et al., "The Effect of Tobacco Monoculture and Crop Rotations on Tobacco Leaf Composition", *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol. 69 (2004) No. 4 (95-101)).

5 La composición química y el contenido de nicotina de las hojas de tabaco están influenciados por la radiación ultravioleta y la intensidad de la luz (Andersen et al., "Chemical listening of tabaco leaves altered by near-ultraviolet and intensity of visible light", *Plant Physiol* (1973) 51, 723-726).

10 Los métodos de preparación de los extractos también influyen en el contenido de nicotina, en particular los tiempos y condiciones de maceración, los métodos de esterilización y las separaciones físicas y químicas.

Un extracto de tabaco como el descrito en la solicitud PCT/FR2007/000786 comprende moléculas de bajo peso molecular, es decir inferior a 10 kDa. Entre estas moléculas de bajo peso molecular, se pueden citar en particular las N-nitrosaminas (TSNA) y los ácidos N-nitrosoamínicos específicos del tabaco derivados de alcaloides no volátiles, aldehídos volátiles, hidrocarburos aromáticos polinucleares (tal como el benzo[a]pireno), lactonas, uretanos, o metales tales como cadmio, por ejemplo (véase Wagner et al., *Plant Physiol*. 1986, 82, 274-279 y IARC Monographs on the Assessment of Carcinogenic Risks to Human, vol.49). Estos compuestos pueden ser cancerígenos, mutagénicos o tóxicos, y pueden provocar cánceres, problemas renales o óseos. Estos compuestos son por lo tanto perjudiciales para la salud del paciente al que se le ha administrado una composición que los comprende.

20 Tal extracto de tabaco comprende muchas proteínas de cualquier peso molecular. La base de datos SwissProt identifica así 759 proteínas del tabaco. La proteína RuBisCO por sí sola puede representar de 30 a 50 % de las proteínas solubles. Una proteína RuBisCO completa tiene típicamente ocho subunidades que forman un complejo proteico de aproximadamente 540 kDa. La toxicidad de estas proteínas administradas por vía subcutánea en una disolución que las comprende es desconocida, mientras que nada indica que todas o algunas de ellas puedan estar implicadas en algún efecto terapéutico.

30 El documento US2014/343254 describe métodos para purificar extractos de plantas enriquecidos en proteínas RuBisCO y en proteínas de la fracción F2 (ricas en proteínas solubles citoplasmáticas y de cloroplastos con pesos moleculares comprendidos entre 3 kDa y 100 kDa), para eliminar impurezas y contaminantes y/o para modificar las características sensoriales del extracto, en particular extractos de tabaco. Los extractos descritos en este documento comprenden 75-85 % de proteína RuBisCO en peso del extracto.

35 El objetivo de la presente invención es proporcionar un tratamiento eficaz para la adicción al tabaco. Ventajosamente, este tratamiento no es tóxico, es bien tolerado por los pacientes y presenta un riesgo limitado al reducir al máximo posible la administración de moléculas de toxicidad desconocida y que, a priori, no tienen efecto terapéutico.

40 Mientras que los extractos de tabaco contienen miles de compuestos, la solicitante ha descubierto sorprendentemente que las proteínas de los extractos de hojas de tabaco permiten inducir una respuesta inmunitaria específica de tipo IgG que favorece el dejar de fumar. Así, el extracto de hojas de tabaco, como se describe a continuación, que comprende un alto contenido en proteínas y una composición proteica particular, permite inducir una respuesta inmune de tipo IgG específica que favorece el dejar de fumar.

45 Este descubrimiento es tanto más sorprendente que los extractos acuosos de hojas de tabaco contienen miles de compuestos, y las proteínas constituyen sólo una familia de compuestos entre otras. Las proteínas del tabaco no son conocidas por desempeñar un papel en la adicción al tabaco y, por lo tanto, no existe ningún incentivo para utilizarlas para dejar de fumar.

50 La solicitante muestra en particular que los extractos de hojas de tabaco según la invención tienen un alto contenido en proteínas y una composición proteica particular. Esta composición proteica particular se puede obtener en particular cuando se utilizan hojas de tabaco secas. El secado favorece la degradación de proteínas, por ejemplo a través de mecanismos de hidrólisis, y el aumento de aminoácidos libres en las hojas de tabaco (Hamilton & Lowe, 1978; Long & Weybrew, 1981; Burton, et al., 1983).

55 La solicitante ha descubierto sorprendentemente que las proteínas de extractos de hojas de tabaco según la invención permiten inducir la generación de anticuerpos IgG específicos que favorecen el dejar de fumar. La solicitante muestra que la administración del extracto de hojas de tabaco según la invención induce la respuesta inmunitaria de tipo IgG específica y permite obtener un tratamiento eficaz de la adicción al tabaco, incluso sin añadir al extracto un adyuvante que pueda favorecer una respuesta inmunitaria. La solicitante muestra que la respuesta inmunitaria específica de tipo IgG, el tratamiento de la adicción al tabaco y el dejar de fumar son particularmente eficaces cuando se utilizan extractos de hojas secas de tabaco.

65 Este descubrimiento es tanto más sorprendente que nada en la técnica anterior indica que los anticuerpos IgG específicos de las proteínas de los extractos de hojas de tabaco sean susceptibles de ayudar a los fumadores a reducir o detener su consumo de tabaco. La activación de una respuesta inmune de tipo IgG específica tras la administración de extractos de tabaco, y el papel de los extractos de tabaco en dejar de fumar no se habían descrito jamás hasta

ahora. Tal relación entre el sistema inmunitario (implicado en particular en la producción de anticuerpos IgG específicos) y el sistema nervioso (implicado en particular en la percepción del acto de fumar y en el comportamiento) que puede favorecer el dejar de fumar no se había descrito jamás hasta ahora.

- 5 Ventajosamente, el tratamiento de la adicción al tabaco según la presente invención requiere la administración de la composición farmacéutica según la invención sólo unas pocas veces, ventajosamente una sola administración, para que los efectos de refuerzos del cigarrillo ya no se sientan o se sientan significativamente atenuados por el paciente, y en particular el deseo de fumar (refuerzo positivo), se reduce la apetencia por el cigarrillo.

10 RESUMEN DE LA INVENCION

La invención es en particular tal como se define en las reivindicaciones.

- 15 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un extracto de hojas de tabaco que contiene al menos un 5 % en peso, con respecto al peso total del extracto seco, de proteínas de masa molecular superior a 10 kDa, y esencialmente libre de moléculas de masa molecular de peso inferior a 10 kDa, eligiéndose dichas proteínas preferentemente del grupo formado por las siguientes familias de proteínas: peroxidasa aniónica formadora de lignina, glucano endo-1,3-beta-glucosidasa, endoquitinasa, proteína relacionada a la patogénesis, osmotina e inhibidor de la

20 caracterizándose dicho extracto de hojas de tabaco por que:

- el contenido de proteínas cuya masa molecular es superior a 500 kDa, preferentemente cuya masa molecular es superior a 400 kDa, más preferentemente cuya masa molecular es superior a 300 kDa, de manera preferida cuya masa molecular es superior a 200 kDa, de manera más preferente cuya masa molecular es superior a 150 kDa, de manera más preferente cuya masa molecular es superior a 100 kDa y de manera más preferente aún cuya masa molecular es superior a 50 kDa, es inferior a 15 % en peso con respecto al peso proteico total del extracto, preferentemente inferior a 10 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, más preferiblemente inferior a 7,5 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, preferiblemente incluso inferior a 5 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, de manera preferida inferior a 2,5 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, de manera incluso más preferida inferior a 1 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, y mejor aún inferior a 0,5 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto; y
- el contenido en moléculas con una masa molecular inferior a 10 kDa es inferior a 5 % en peso con respecto al peso total del extracto, preferentemente inferior a 2,5 % en peso, y mejor aún inferior a 1 % en peso.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, un extracto de hojas de tabaco según la invención así como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica según la invención, que comprende dicho extracto de hojas de tabaco, para su uso en el tratamiento de la adicción al tabaco (por ejemplo para su uso para dejar de fumar), o para su uso en el tratamiento conjunto de la adicción al tabaco y al cannabis.

Se describe además aquí, según un aspecto que no forma parte de la invención tal como se reivindica, un método para tratar la adicción al tabaco que comprende la administración de dicho extracto de hojas de tabaco a un sujeto que sufre adicción o dependencia al tabaco.

Según un aspecto que no forma parte de la invención tal como se reivindica, se describe aquí un método para tratar la adicción al tabaco que comprende la administración de dicha composición farmacéutica que comprende dicho extracto de hojas de tabaco a un sujeto que sufre adicción al tabaco.

En el ámbito de la presente invención, el tratamiento de la dependencia o de la adicción al tabaco abarca todas las formas de consumo de tabaco, a saber, el tabaco fumado, en forma de cigarrillos elaborados o liados, cigarrillos o puros, tabaco fumado en pipa, pero también tabaco no fumado, tales como tabaco para esnifar, mascar o chupar.

La invención se refiere también al procedimiento de preparación de dicho extracto de hojas de tabaco que contiene al menos 5 % en peso, con respecto al peso total del extracto seco, de proteínas con una masa molecular superior a 10 kDa y esencialmente libre de moléculas de masa molecular inferior a 10 kDa que comprende las siguientes etapas:

- a. Secar hojas de tabaco,
- b. Triturar hojas de tabaco secas para obtener un triturado de hojas de tabaco secas,
- c. Extraer el material triturado de hojas de tabaco secas bajo agitación mecánica con un disolvente, por ejemplo un disolvente acuoso, preferiblemente una disolución tampón acuosa con un pH comprendido entre 6,0 y 8,5,

d. Separar los residuos sólidos de la disolución del extracto del triturado de hojas secas de tabaco mediante filtración o centrifugación a fin de obtener una disolución de extracto de triturado de hojas de tabaco secas sin residuo sólido,

e. Diafiltrar a volumen constante la disolución obtenida en la etapa d con un disolvente, preferentemente un disolvente acuoso, en una cantidad que oscila de 2 a 12 veces en volumen, preferentemente de 3 a 10 veces en volumen, preferentemente de 4 a 8 veces en volumen, preferiblemente 6 veces en volumen, con respecto al volumen del extracto, y con una membrana que tiene un umbral de corte de 10 kDa,

F. Eventualmente, liofilizar la disolución proteica obtenida en la etapa e.

Se describe además aquí, un kit que comprende una composición farmacéutica que comprende dicho extracto de hojas de tabaco que contiene al menos 5 % en peso, con respecto al peso total del extracto seco, de proteínas con una masa molecular superior a 10 kDa y esencialmente libre de moléculas con una masa molecular inferior a 10 kDa.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ilustración de un perfil electroforético del extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1: Fraccionamiento en gel NuPage 4 %-12 % en tampón MES y en presencia de agente reductor.

Figura 2. Inducción de IgG después de la inyección del extracto de hojas de tabaco según el ejemplo 1 en ratones.

Figura 3. Ilustración de inmunofenotipaje para la caracterización de células inmunes activadas.

Figura 4. Activación de células Natural Killer mediante el extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1.

Figura 5. Actividad del extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 sobre los linfocitos T y B.

Figura 6. Inducción de citoquinas proinflamatorias y de IFN γ por el extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1.

Figura 7. Inducción de citocinas TH2 y de quimiocinas, y factor de crecimiento hematopoyético mediante el extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1.

Figuras 8 y 9. Evolución del consumo de tabaco en pacientes tratados con la administración de extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

Extracto de hojas de tabaco

La presente invención se refiere a un extracto de hojas de tabaco que contiene al menos un 5 % en peso, con respecto al peso total del extracto seco, de proteínas de masa molecular superior a 10 kDa, y esencialmente libre de moléculas de masa molecular de peso inferior a 10 kDa, eligiéndose dichas proteínas preferentemente del grupo formado por las siguientes familias de proteínas: peroxidasa aniónica formadora de lignina, glucano endo-1,3-beta-glucosidasa, endoquitinasa, proteína relacionada a la patogénesis, osmotina e inhibidor de la proteínasa, así como sus mismos;

caracterizándose dicho extracto de hojas de tabaco por que:

- el contenido de proteínas cuya masa molecular es superior a 500 kDa, preferentemente cuya masa molecular es superior a 400 kDa, más preferentemente cuya masa molecular es superior a 300 kDa, de manera preferida cuya masa molecular es superior a 200 kDa, de manera más preferente cuya masa molecular es superior a 150 kDa, de manera más preferente cuya masa molecular es superior a 100 kDa y de manera más preferente aún cuya masa molecular es superior a 50 kDa, es inferior a 15 % en peso con respecto al peso proteico total del extracto, preferentemente inferior a 10 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, más preferiblemente inferior a 7,5 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, preferiblemente incluso inferior a 5 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, de manera preferida inferior a 2,5 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, de manera incluso más preferida inferior a 1 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, y mejor aún inferior a 0,5 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto; y

- el contenido en moléculas con una masa molecular inferior a 10 kDa es inferior a 5 % en peso con respecto al peso total del extracto, preferentemente inferior a 2,5 % en peso, y mejor aún inferior a 1 % en peso.

5 Preferiblemente, el extracto de hojas de tabaco contiene al menos 10 % en peso con respecto al peso total del extracto seco, preferiblemente al menos 15 % en peso, preferiblemente aproximadamente 20 % en peso de proteínas de masa molecular superior a 10 kDa, y está esencialmente libre de moléculas con una masa molecular inferior a 10 kDa. El extracto de hojas de tabaco según la invención es en particular tal como se define en las reivindicaciones.

10 El extracto seco se obtiene ventajosamente antes de liofilizar el extracto de hojas de tabaco según la invención, después se coloca en una cámara de vacío, preferentemente en presencia de P_2O_5 , hasta obtener una masa de extracto constante.

Se entiende aquí por "aproximadamente" más o menos 1 % debido a incertidumbres en las medidas.

15 El contenido de proteínas con una masa molecular superior a 10 kDa medida habitualmente en los extractos de hojas de tabaco es de aproximadamente 1 %. El extracto de hojas de tabaco según la presente invención tiene por lo tanto un contenido en proteínas con una masa molecular superior a 10 kDa, mucho más elevado que lo conocido hasta ahora.

20 Preferiblemente, las proteínas presentes en el extracto según la presente invención se eligen del grupo constituido por las siguientes familias de proteínas: peroxidasa aniónica formadora de lignina, glucano endo-1,3-beta-glucosidasa, endoquitinasa, proteína relacionada a la patogénesis, osmotina e inhibidor de proteinasa, así como sus mezclas.

25 Los nombres indicados para las proteínas presentes en el extracto según la presente invención corresponden a los nombres introducidos en la base de datos Swissprot, que es una base de datos biológica que cataloga las secuencias de proteínas.

30 Según una realización, el extracto de hojas de tabaco según la invención comprende al menos una proteína que pertenece a la familia de las glucano endo-1,3-beta-glucosidasas, y preferentemente elegida entre la isoforma ácida PR-Q' de la beta-1,3-endoglucanasa (PR36401 según la base UniProt), la isoforma vacuolar básica GLB de la beta-1,3-endoglucanasa (P27666 según la base UniProt), y sus mezclas.

35 Según una realización, el extracto de hojas de tabaco según la invención comprende al menos una proteína que pertenece a la familia de las endoquitinasas, y preferentemente escogida de la endoquitinasa P ácida (P17513 según la base UniProt), la endoquitinasa Q ácida (P17514 según la base de UniProt), endoquitinasa B (P24091 según la base UniProt), y sus mezclas.

40 Según una realización, el extracto de hojas de tabaco según la invención comprende al menos osmotina (P14170 según la base UniProt).

Según una realización, el extracto de hojas de tabaco según la invención comprende al menos una peroxidasa aniónica que forma lignina (P11965 según la base UniProt).

45 Según una realización, el extracto de hojas de tabaco según la invención comprende al menos una proteína relacionada a la patogénesis, y preferentemente elegida entre la proteína R relacionada a la patogénesis (P13046 según la base UniProt), la proteína PR-4A relacionada con la patogénesis (PR29062 según la base UniProt), la proteína PR-4B relacionada con la patogénesis (PR29063 según la base UniProt), y sus mezclas.

50 Según una realización, el extracto de hojas de tabaco según la presente invención comprende al menos una proteína que pertenece a la familia de los inhibidores de proteinasa, y preferentemente elegida entre el inhibidor de proteinasa I-B (Q03199 según la base UniProt), el inhibidor de proteinasa I-A (Q03198 según la base UniProt), y sus mismos.

Según una realización, el extracto de hojas de tabaco comprende también polisacáridos con una masa molecular superior a 10 kDa y preferentemente hidrosolubles.

55 Preferiblemente, el extracto de hojas de tabaco según la presente invención comprende al menos 5 % en peso con respecto al peso total del extracto seco, preferiblemente al menos 10 % en peso, preferiblemente al menos 15 % en peso, preferiblemente aproximadamente 20 % en peso de proteínas elegidas del grupo constituido por las siguientes familias de proteínas: peroxidasa aniónica formadora de lignina, glucano endo-1,3-beta-glucosidasa, endoquitinasa, proteína relacionada a la patogénesis, osmotina e inhibidor de proteinasa, así como sus mezclas.

60 Según una realización, el extracto de hojas de tabaco según la presente invención está esencialmente libre de proteínas de alta masa molecular.

65 Se entiende aquí por "proteína de alta masa molecular" una proteína cuya masa molecular es superior a 500 kDa, preferentemente cuya masa molecular es superior a 400 kDa, más preferentemente cuya masa molecular es superior

a 300 kDa, de manera preferida cuya masa molecular es superior a 200 kDa, de manera más preferida aún cuya masa molecular es superior a 150 kDa, y mejor aún cuya masa molecular es superior a 100 kDa.

5 Según una realización, el extracto de hojas de tabaco según la presente invención está esencialmente libre de proteínas cuya masa molecular es superior a 50 kDa.

10 Se entiende aquí por "esencialmente libre" un contenido de moléculas inferior a 15 % en peso con respecto al peso total de proteínas del extracto, preferentemente un contenido de moléculas inferior a 10 % en peso con respecto al peso total de proteínas del extracto, preferentemente incluso inferior a 7,5 % en peso con respecto al peso total de proteínas del extracto, más preferentemente inferior a 5 % en peso con respecto al peso total de proteínas del extracto, de manera preferida inferior a 2,5 % en peso con respecto al total peso de proteínas del extracto, de manera más preferida inferior a 1 % en peso con respecto al peso total de proteínas del extracto, y mejor aún inferior a 0,5 % en peso con respecto al peso total de proteínas del extracto.

15 A título ilustrativo, el contenido en proteínas de alta masa molecular es inferior a 15 % en peso con respecto al peso total de proteínas del extracto, preferentemente inferior a 10 % en peso con respecto al peso total de proteínas del extracto, preferentemente incluso inferior a 7,5 % en peso con respecto al peso total de proteínas del extracto, más preferentemente inferior a 5 % en peso con respecto al peso total de proteínas del extracto, de manera preferida inferior a 2,5 % en peso con respecto al total peso de proteínas del extracto, de manera más preferida inferior a 1 % en peso con respecto al peso total de proteínas del extracto, y mejor aún inferior a 0,5 % en peso con respecto al peso total de proteínas del extracto.

25 Según una realización, el extracto de hojas de tabaco según la presente invención está esencialmente libre de proteínas RuBisCO.

30 Según una realización, las hojas de tabaco son de la variedad *Nicotiana Tabacum* o de la variedad *Nicotiana Rustica*. Las hojas de tabaco pueden proceder de un tabaco marrón o rubio y pueden elegirse en particular entre el tabaco Virginia, el tabaco Burley, el tabaco oriental, el tabaco Latakia, el tabaco Périque, el tabaco Maryland, el tabaco Kentucky, el tabaco de California, el tabaco Tex Mex, y sus mezclas.

Por supuesto, el extracto no está necesariamente constituido por un extracto puro de hojas de tabaco y proteínas extraídas del cannabis, se pueden añadir para tratar conjuntamente la dependencia al tabaco y al cannabis.

35 Según una realización particular, el extracto de hojas de tabaco se obtiene a partir de una mezcla 1/1/1 de tabaco marrón, de tabaco de Virginia y de Burley.

Según una realización particular, el extracto de hojas de tabaco se obtiene a partir del tabaco Burley.

40 Según una realización, el extracto de hojas de tabaco se obtiene a partir de hojas de tabaco secas.

Según una realización particular, el extracto de hojas de tabaco se obtiene a partir de hojas de tabaco secadas al aire libre.

45 Según una realización particular, el extracto de hojas de tabaco se obtiene a partir de hojas de tabaco secadas al aire libre durante un período adaptado a las condiciones climáticas locales, preferentemente durante un período mínimo de un mes.

50 Se entiende aquí por "secado al aire libre" o "secado natural", un secado realizado en presencia de aire libre natural, en el exterior o en el interior. El secado al aire libre se puede llevar a cabo en un local abierto o cerrado, cubierto o no. El secado al aire libre puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un secador natural. En este caso, las hojas de tabaco recién cosechadas o presecadas se dejan secar de forma natural bajo el efecto del aire libre. Las hojas de tabaco se pueden suspender, por ejemplo, en cobertizos ventilados sin calefacción. Las hojas de tabaco se pueden dejar secar, por ejemplo, de forma natural hasta que adquieran un color marrón. En esta etapa, casi no queda azúcar en la hoja. Ventajosamente, el secado se lleva a cabo durante un período adaptado a las condiciones climáticas locales, preferentemente durante un período mínimo de un mes. A título de ejemplo, el secado se puede llevar a cabo entre septiembre y diciembre para las cosechas del centro de Francia. Las hojas de tabaco se pueden voltear o airear una o más veces durante el secado, de manera a permitir un secado homogéneo y evitar la formación de condensación, la pudrición o la degradación de las hojas. El método de secado al aire se puede utilizar, por ejemplo, para el tabaco de la variedad Burley.

60 Según una realización particular, el extracto de hojas de tabaco se obtiene a partir de hojas de tabaco secadas en secador natural.

65 Según otra realización particular, el extracto de hojas de tabaco se obtiene a partir de hojas de tabaco secadas en secador con calefacción. En este caso, el secado se puede llevar a cabo en un cobertizo o en una habitación calentada a una temperatura adecuada.

Según otra realización particular, el extracto de hojas de tabaco se obtiene a partir de hojas de tabaco secadas por secado en horno. En este caso, el secado se puede llevar a cabo en una habitación o cobertizo calentado a una temperatura adaptada. El calor puede introducirse en la habitación o el cobertizo a través de conductos conectados a una caldera externa. Este calentamiento controlado permite obtener hojas de color amarillo-naranja. Estas hojas contienen entonces un alto nivel de azúcar. Según este método, se puede secar, por ejemplo, el tabaco de Virginia.

Según otra realización particular, el extracto de hojas de tabaco se obtiene a partir de hojas de tabaco secadas por secado al Sol. En este caso, las hojas de tabaco se pueden extender sobre zarzos y exponerlas al Sol durante 12 a 30 días. Bajo el calor directo y la radiación del Sol, las hojas adquieren un color amarillo o naranja y conservan un alto nivel de azúcar. El tabaco oriental se seca generalmente según este método.

Según otra realización particular, el extracto de hojas de tabaco se obtiene a partir de hojas de tabaco secadas por secado con fuego. En este caso, se puede quemar leña debajo de las hojas de tabaco, que se secan y se impregnan de un aroma "ahumado".

El extracto de hojas de tabaco según la presente invención es ventajosamente un extracto acuoso.

El extracto de hojas de tabaco según la presente invención es ventajosamente un extracto acuoso de color marrón.

Preferiblemente, el extracto de hojas de tabaco es susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento de extracción con un disolvente, por ejemplo un disolvente acuoso, de un triturado de hojas de tabaco secas seguido de una separación de los residuos sólidos de la disolución de extracto triturado de hojas de tabaco secas, después de una diafiltración a volumen constante de la disolución de extracto de triturado de hojas de tabaco secas sin residuo sólido con un disolvente acuoso en una cantidad que varía de 2 a 12 veces en volumen, preferiblemente de 3 a 10 veces en volumen, preferiblemente de 4 a 8 veces en volumen, preferiblemente 6 veces en volumen, con respecto al volumen del extracto y con una membrana que tiene un umbral de corte de 10 kDa.

Por supuesto, se pueden utilizar otros tipos de disolventes para realizar el procedimiento de extracción del extracto de hojas de tabaco. La extracción de la etapa c se puede llevar a cabo con un disolvente orgánico o inorgánico, o con una mezcla de disolventes orgánicos y/o inorgánicos.

Para asegurar una buena eficacia y un buen rendimiento de extracción, y para obtener un extracto de buena calidad que tiene las propiedades de pureza y la composición deseadas, el experto en la técnica podrá seleccionar fácilmente el o los disolventes apropiados según los siguientes criterios:

- la polaridad del disolvente o de la mezcla de disolventes (polar o no polar);
- el estado físico del disolvente o de la mezcla de disolventes (por ejemplo líquido, sólido, supercrítico o gaseoso);
- la naturaleza química del disolvente o de la mezcla de disolventes (por ejemplo orgánica o inorgánica);
- la carga del disolvente o de la mezcla de disolventes (por ejemplo iónica o no iónica);
- el origen del disolvente o de la mezcla de disolventes;
- la miscibilidad del disolvente o de la mezcla de disolventes;
- la solubilidad del disolvente o de la mezcla de disolventes.

El experto en la técnica sabrá qué técnica utilizar para seleccionar el o los disolventes que corresponden a sus criterios, en función del rendimiento de extracción, de la pureza y de la composición del extracto deseado.

Ventajosamente, el extracto de hojas de tabaco según la presente invención se obtiene mediante el procedimiento de preparación de hojas de tabaco que se describe a continuación.

Composición farmacéutica

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, un extracto de hojas de tabaco según la invención así como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se describe aquí una composición farmacéutica que comprende, a título de principio activo, el extracto de hojas de tabaco como se describe anteriormente.

La composición farmacéutica según la invención es en particular tal como se define en las reivindicaciones.

La composición farmacéutica según la presente invención comprende además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como disolventes farmacéuticamente aceptables y, por ejemplo, agua.

Ventajosamente, la composición farmacéutica comprende proteínas presentes en el extracto de hojas de tabaco según la invención en un contenido que oscila de 1 a 1000 µg/ml, preferentemente de 10 a 500 µg/ml, preferentemente de 50 a 300 µg/ml, preferentemente de 60 a 200 µg/ml, preferentemente de 80 a 150 µg/ml.

La composición farmacéutica según la invención es preferentemente una composición acuosa.

Según una realización particular, la composición farmacéutica puede comprender además un principio activo que actúa sobre el refuerzo negativo, tal como, por ejemplo, un sustituto de la nicotina, la vareniclina o el bupropión.

Según una realización, la composición farmacéutica comprende además un adyuvante. Se pueden citar en particular como adyuvantes agentes hinchantes tales como por ejemplo un azúcar tal como lactosa, sacarosa, trehalosa, sorbitol, glucosa, rafinosa, manitol, preferiblemente lactosa, sacarosa, trehalosa, glucosa o manitol, un aminoácido tal como arginina, glicina o histidina, preferentemente glicina, o polímeros de tipo dextrano o polietilenglicol, o sus mezclas. Según esta realización, la composición farmacéutica comprende de 50 a 99 % en peso de adyuvantes, preferentemente de 80 a 97 % en peso, con respecto al peso total de la composición farmacéutica.

Según una realización particular, la composición farmacéutica también puede comprender proteínas extraídas del cannabis.

Según una realización, la composición farmacéutica según la presente invención se presenta en una forma adecuada para una administración subcutánea.

Según otra realización, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para una administración con la ayuda de un sistema terapéutico transdérmico adhesivo. Ventajosamente, la composición farmacéutica se presenta en forma de parche.

Según otra realización, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para una administración mediante pulverización o vaporización. Ventajosamente, la composición farmacéutica se presenta en forma de pulverizador, vaporizador o spray.

La composición farmacéutica según la invención se prepara preferentemente según el procedimiento de preparación de una composición farmacéutica que comprende el extracto de hojas de tabaco descrito a continuación.

Uso de la composición farmacéutica

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica según la invención para su uso en el tratamiento de la adicción al tabaco, o para su uso en el tratamiento en conjunto de la adicción al tabaco y al cannabis.

También se describe aquí, según un aspecto que no forma parte de la invención, el uso de la composición farmacéutica para el tratamiento de la adicción al tabaco.

La composición farmacéutica para su uso según la invención es en particular tal como se define en las reivindicaciones.

Por "tratamiento de la adicción al tabaco" o por "tratamiento de la dependencia al tabaco" se entiende más precisamente aquí la reducción de los refuerzos adictivos de los cigarrillos. La administración de la composición farmacéutica según la invención permite en particular reducir los refuerzos positivos de los cigarrillos y en particular el deseo de fumar.

También se describe aquí una composición que comprende un extracto de hojas de tabaco como se define anteriormente para su uso en el tratamiento de la adicción al tabaco.

En otras palabras, también se describe aquí, según un aspecto que no forma parte de la invención tal como se reivindica, un método para tratar la adicción o la dependencia al tabaco, que comprende la administración de una composición que comprende un extracto de hojas de tabaco como se define anteriormente.

Ventajosamente, la administración de la composición según la invención permite al paciente dejar de fumar, reducir su consumo o prevenir su recaída después de dejar de fumar atenuando los refuerzos positivos del tabaco y en particular el deseo de fumar, facilitando así el dejar de fumar. Ventajosamente, la administración de la composición

ayuda a cualquier tipo de fumador, es decir, incluidos los grandes fumadores, a dejar de fumar, a reducir o evitar las recaídas en caso de dejar de fumar.

5 Ventajosamente, la administración de la composición según la invención que comprende además proteínas extraídas del cannabis permite tratar conjuntamente la dependencia o la adicción al tabaco y al cannabis.

Según una realización, la composición según la presente invención se administra mediante inyección subcutánea. Según esta realización, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para la administración subcutánea.

10 Según una realización, la composición farmacéutica se presenta en una forma de dosificación de 0,03 ml a 10 ml, preferiblemente de 0,1 ml a 5 ml, preferiblemente de 0,5 a 2 ml. La composición farmacéutica se administra entonces preferiblemente en una cantidad de 0,03 ml a 10 ml, preferiblemente de 0,1 a 5 ml, preferiblemente de 0,5 ml a 2 ml mediante inyección subcutánea.

15 Según una realización, la composición según la presente invención se administra con la ayuda de un sistema terapéutico transdérmico adhesivo que contiene el extracto de hojas de tabaco tal como se define anteriormente. Según esta realización, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para una administración con la ayuda de un sistema terapéutico transdérmico adhesivo. Ventajosamente, la composición farmacéutica se presenta en forma de parche.

20 El parche puede tener la forma de un parche de tipo depósito con uno o más compartimentos o bien de tipo matricial. La realización práctica de los parches será determinada por el experto en la técnica en aplicación de sus conocimientos generales en la materia para obtener una administración sistémica controlada y prolongada del extracto de hojas de tabaco, durante todo el período de aplicación del parche, por ejemplo por un periodo de aproximadamente 2 h a 24 h.

25 El tipo de parche depósito comprenderá uno o más depósitos separados que contienen el o los principios activos (incluido el extracto de hojas de tabaco) en disolución o suspensión en la matriz polimérica que entra en contacto con la piel por medio de una membrana polimérica semipermeable, lo que permite ajustar la velocidad de liberación del o de los principios activos.

30 El parche de tipo matricial comprenderá una masa polimérica en cuyo interior se disolverán o dispersarán el o los principios activos en las proporciones adecuadas. La liberación de estos principios activos se lleva a cabo por difusión a través de las cadenas poliméricas de dicha matriz.

35 Según un ejemplo particular de este tipo de parche, el adhesivo cubre toda la superficie de liberación de la matriz y forma parte integrante de esta última. Se encuentra así en presencia de un parche de tipo adhesivo activo bien conocido por el experto en la técnica que resulta en una fabricación simplificada y que permite realizaciones de parches de bajo grosor y de flexibilidad apropiada que permiten una aplicación cómoda sobre la piel del paciente.

40 Para garantizar una buena infusión de estos ingredientes activos de manera subcutánea, o en la circulación sanguínea, en la dosis adecuada, a la velocidad de difusión adecuada, y durante un período adecuado, el expertos en la técnica puede establecer fácilmente los siguientes parámetros:

- 45
- la relación de las superficies y de los volúmenes de cada uno de los compartimentos del parche;
 - la eventual adición de uno o más aditivos hidrófilos;
 - la eventual adición de uno o más agentes activadores o inhibidores de la difusión;

50

 - la eventual adición de uno o más agentes de solubilización;
 - la eventual adición de uno o más agentes estabilizantes;

55

 - la eventual adición de uno o más promotores de absorción, y;
 - más generalmente, cualquier tipo de aditivos bien conocidos por el experto en la materia que permiten controlar adecuadamente los flujos y la estabilidad del extracto de hojas de tabaco.

60 El experto en la técnica sabrá qué técnica utilizar para establecer los parámetros enumerados anteriormente en función de la solubilidad y de la estabilidad deseada.

El experto en la técnica adaptará fácilmente los diversos parámetros para fabricar el parche para llegar a la dosis deseada.

65

De manera conocida en sí, tal parche comprende una película protectora que se puede retirar destinada a conservar la cara adhesiva que se va a aplicar sobre la piel después de la fabricación del parche y durante todo su período de almacenamiento. De manera conocida en sí, el experto en la materia recurrirá, por ejemplo, a películas de poliéster, de las cuales una de las caras puede ser tratada con siliconas antiadherentes.

Según otra realización, la composición según la presente invención se administra con la ayuda de un sistema de pulverización o de vaporización que contiene el extracto de hojas de tabaco. Según esta realización, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para una administración mediante pulverización o vaporización. Ventajosamente, la composición farmacéutica se presenta en forma de pulverizador, vaporizador o spray.

El pulverizador, el vaporizador o el spray puede presentarse en forma de un pulverizador, teniendo el vaporizador o spray un depósito con uno o más compartimentos. La producción práctica de pulverizadores, vaporizadores o sprays será determinada por el experto en la técnica en aplicación de sus conocimientos generales en la materia para obtener una administración sistémica controlada y prolongada del extracto de hojas de tabaco.

El pulverizador, el vaporizador o el pulverizador comprenderá uno o más depósitos separados que contienen el o los ingredientes activos (incluido el extracto de hojas de tabaco) en disolución o en suspensión. El o los ingredientes activos se administran entonces mediante pulverización o vaporización sobre la zona del cuerpo a tratar. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la pulverización o la vaporización sobre la piel. El o los ingredientes activos se pueden administrar mediante pulverización o vaporización en las membranas mucosas.

Para garantizar una buena infusión de estos ingredientes activos de manera subcutánea, o en la circulación sanguínea, en la dosis adecuada, a la velocidad de difusión adecuada, y durante un período adecuado, el expertos en la técnica puede establecer fácilmente los siguientes parámetros:

- la relación de las superficies y volúmenes de cada uno de los compartimentos o depósito del pulverizador, vaporizador o pulverizador;
- la eventual adición de uno o más aditivos hidrófilos;
- la eventual adición de uno o más agentes activadores o inhibidores de la difusión;
- la eventual adición de uno o más agentes de solubilización;
- la eventual adición de uno o más agentes estabilizantes;
- la eventual adición de uno o más promotores de absorción, y;
- más generalmente, cualquier tipo de aditivos bien conocidos por el experto en la materia que permiten controlar adecuadamente los flujos y la estabilidad del extracto de hojas de tabaco.

El experto en la técnica sabrá qué técnica utilizar para establecer los parámetros enumerados anteriormente en función de la solubilidad y de la estabilidad deseada.

El experto en la técnica adaptará fácilmente los diversos parámetros para fabricar el pulverizador, el vaporizador o el spray para conseguir a la dosis deseada.

Según una primera realización, la composición farmacéutica se presenta en una forma destinada a ser administrada una sola vez. Según esta realización, la composición farmacéutica se administra una sola vez, permitiendo así una reducción o incluso la supresión de los refuerzos positivos del tabaco y, en particular, del deseo de fumar.

Según otra realización, la composición farmacéutica se presenta en una forma destinada a ser administrada varias veces, preferiblemente dos o tres veces. Según esta realización, la composición farmacéutica se administra preferentemente los días D0 y D10, o los días D0 y D10, D10 y D30, permitiendo así una reducción o incluso una supresión de los refuerzos positivos del tabaco y, en particular, del deseo de fumar. En esta realización, la dosis inyectada la segunda vez, y eventualmente la tercera vez, es idéntica a la dosis inyectada la primera vez.

Según una realización particular, la composición farmacéutica según la presente invención puede administrarse con una composición que comprende un principio activo que actúa sobre el refuerzo negativo, tal como un sustituto de la nicotina, la vareneclina, el bupropión, o sus mezclas. Según esta realización, se pueden considerar varios modos particulares de administración:

- (i) una administración previa al intento de dejar de fumar de la composición farmacéutica según la invención a fin de reducir el consumo de cigarrillos, seguida de la administración del principio activo que actúa sobre el

refuerzo negativo a fin de limitar los efectos del refuerzo negativo, y en particular el sentimiento de abstinencia;

(ii) una administración concomitante de la composición farmacéutica según la invención y de un principio activo que actúa sobre el refuerzo negativo en el momento del intento de dejar de fumar, con el objetivo de dejar de fumar inmediatamente;

(iii) una administración en el momento del intento de dejar de fumar de un principio activo que actúa sobre el refuerzo negativo, por ejemplo durante 12 semanas después del intento de dejar de fumar, seguida de una administración de la composición farmacéutica según la invención, por ejemplo durante 2 semanas después del final de la administración del principio activo que actúa sobre el refuerzo negativo, con el objetivo de prevenir las recaídas.

Preparación del extracto de hojas de tabaco

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a la preparación de un extracto de hojas de tabaco según la presente invención.

El procedimiento para preparar un extracto de hojas de tabaco según la invención es en particular tal como se define en las reivindicaciones.

El procedimiento para preparar el extracto de hojas de tabaco según la presente invención comprende las siguientes etapas:

a. Secar hojas de tabaco,

b. Triturar hojas de tabaco secas para obtener un triturado de hojas de tabaco secas,

c. Extraer el material triturado de hojas de tabaco secas bajo agitación mecánica con un disolvente, por ejemplo un disolvente acuoso, preferiblemente una disolución tampón acuosa con un pH comprendido entre 6,0 y 8,5,

d. Separar los residuos sólidos de la disolución del extracto del triturado de hojas secas de tabaco mediante filtración o centrifugación a fin de obtener una disolución de extracto de triturado de hojas de tabaco secas sin residuo sólido,

e. Diafiltrar a volumen constante la disolución obtenida en la etapa d con un disolvente, preferentemente un disolvente acuoso, en una cantidad que oscila de 2 a 12 veces en volumen, preferentemente de 3 a 10 veces en volumen, preferentemente de 4 a 8 veces en volumen, preferiblemente 6 veces en volumen, con respecto al volumen del extracto, y con una membrana que tiene un umbral de corte de 10 kDa,

f. Eventualmente, liofilizar la disolución proteica obtenida en la etapa e.

Según una realización particular, el secado de la etapa a se lleva a cabo al aire libre, denominado natural. En este caso, el secado se lleva a cabo en presencia de aire libre natural, en exterior o en interior. El secado se puede llevar a cabo en un local abierto o cerrado, cubierto o no. El secado al aire libre puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un secador natural. En este caso, las hojas de tabaco recién cosechadas o presecadas se dejan secar de forma natural bajo el efecto del aire libre. Las hojas de tabaco se pueden suspender, por ejemplo, en cobertizos ventilados sin calefacción. Las hojas de tabaco se pueden dejar secar, por ejemplo, de forma natural hasta que adquieran un color marrón. En esta etapa, casi no queda azúcar en la hoja. Ventajosamente, el secado se lleva a cabo durante un período adaptado a las condiciones climáticas locales, preferentemente durante un período mínimo de un mes. A título de ejemplo, el secado se puede llevar a cabo entre septiembre y diciembre para las cosechas del centro de Francia. Las hojas de tabaco se pueden voltear una o más veces durante el secado, de manera a permitir un secado homogéneo y evitar la formación de condensación o la pudrición o la degradación de las hojas. El método de secado al aire se puede utilizar, por ejemplo, para el tabaco de la variedad Burley. Según una realización particular, el secado de la etapa a se lleva a cabo en un secador natural.

Según otra realización particular, el secado de la etapa a se lleva a cabo en un secador con calefacción. En este caso, el secado se puede llevar a cabo en un cobertizo o en una habitación calentada a una temperatura adecuada.

Según otra realización particular, el secado de la etapa a se lleva a cabo mediante secado en horno. En este caso, el secado se puede llevar a cabo en una habitación o cobertizo calentado a una temperatura adaptada. El calor puede introducirse en la habitación o el cobertizo a través de conductos conectados a una caldera externa. Este calentamiento controlado permite obtener hojas de color amarillo-naranja. Estas hojas contienen entonces un alto nivel de azúcar. Según este método, se puede secar, por ejemplo, el tabaco de Virginia.

Según otra realización particular, el secado de la etapa a se lleva a cabo mediante secado al Sol. En este caso, las hojas de tabaco se pueden extender sobre zarzos y exponerlas al Sol durante 12 a 30 días. Bajo el calor directo y la radiación del Sol, las hojas adquieren un color amarillo o naranja y conservan un alto nivel de azúcar. El tabaco oriental se seca generalmente según este método.

Según otra realización particular, el secado de la etapa a se lleva a cabo mediante secado con fuego. En este caso, se puede quemar leña debajo de las hojas de tabaco, que se secan y se impregnan de un aroma "ahumado".

De manera ventajosa, el secado de la etapa a favorece la degradación de las proteínas del tabaco de alta masa molecular, tal como RuBisCO, por ejemplo mediante mecanismos de hidrólisis.

Las etapas c a e corresponden a las etapas de extracción, filtración y diafiltración del tipo descrito en la patente US 5.770.698 (columna 6 línea 47 a columna 7 línea 7) y la solicitud de patente US 2009/0162403 (párrafos [0032] a [0040]).

Preferiblemente, la extracción en la etapa c se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 4 y 20°C, preferiblemente entre 4 y 10°C.

Preferiblemente, la extracción en la etapa c se lleva a cabo durante 12 a 36 h, preferiblemente 22 a 26 h, preferiblemente 24 h.

Según una realización particular, el disolvente utilizado en la etapa c es un disolvente acuoso. Preferiblemente, el disolvente acuoso usado en la etapa c es una disolución tampón acuosa de bicarbonato de amonio, preferiblemente en una concentración comprendida entre 2 y 6 g/l, preferiblemente de 4 g/l.

Por supuesto, se pueden usar otros tipos de disolventes para llevar a cabo la extracción de la etapa c. La extracción de la etapa c se puede llevar a cabo con un disolvente orgánico o inorgánico, o con una mezcla de disolventes orgánicos y/o inorgánicos.

Para asegurar una buena eficacia y un buen rendimiento de extracción, y para obtener un extracto de buena calidad que tiene las propiedades de pureza y la composición deseadas, el experto en la técnica podrá seleccionar fácilmente el o los disolventes apropiados según los siguientes criterios:

- la polaridad del disolvente o de la mezcla de disolventes (polar o no polar);
- el estado físico del disolvente o de la mezcla de disolventes (por ejemplo líquido, sólido, supercrítico o gaseoso);
- la naturaleza química del disolvente o de la mezcla de disolventes (por ejemplo orgánica o inorgánica);
- la carga del disolvente o de la mezcla de disolventes (por ejemplo iónica o no iónica);
- el origen del disolvente o de la mezcla de disolventes;
- la miscibilidad del disolvente o de la mezcla de disolventes;
- la solubilidad del disolvente o de la mezcla de disolventes.

El experto en la técnica sabrá qué técnica utilizar para seleccionar el o los disolventes que corresponden a sus criterios, en función del rendimiento de extracción, de la pureza y de la composición del extracto deseado.

Preferiblemente, la extracción en la etapa c se lleva a cabo poniendo en suspensión el triturado de las hojas de tabaco secas en una disolución tampón, preferiblemente a una concentración de triturado de hojas de tabaco secas en la disolución tampón de 30 a 70 g/l, preferiblemente de 40 a 60 g/l, y más preferiblemente de 50 g/l. Los residuos sólidos en suspensión se eliminan a continuación mediante filtración, por ejemplo mediante filtración Büchner (etapa d), a fin de obtener un triturado de hojas de tabaco secas sin residuos sólidos.

Preferiblemente, el disolvente acuoso usado en la etapa d es agua PPI (agua para preparación inyectable).

Ventajosamente, la etapa e permite eliminar más de 99 % de las moléculas de masa molecular inferior a 10 kDa, y en particular los aminoácidos libres, proteínas y péptidos de masa molecular inferior a 10 kDa, y residuos proteicos de masa molecular inferior a 10 kDa que resultan de la degradación de las proteínas de la etapa a.

Preferiblemente, la disolución proteica obtenida en la etapa e se somete a una etapa e', previa a la etapa f, de filtración esterilizante.

El extracto de hojas de tabaco según la invención obtenido al final del procedimiento descrito anteriormente puede conservarse tal cual se obtiene al final de la etapa d' de filtración esterilizante, o liofilizado tal como se obtiene al final de la etapa f.

Preparación de una composición farmacéutica que comprende el extracto de hojas de tabaco

En un quinto aspecto, se describe aquí la preparación de la composición farmacéutica que comprende el extracto de hojas de tabaco.

La composición farmacéutica se puede preparar según un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- a. Preparar un extracto de hojas de tabaco tal como se define anteriormente,
- b. Ajustar la concentración de proteínas para obtener una concentración de proteínas que oscila de 100 a 200 µg/ml,
- c. Añadir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, y
- d. Eventualmente, añadir a este extracto de adyuvante o adyuvantes, preferiblemente añadir manitol.

El extracto de hojas de tabaco usado en la etapa b puede ser el obtenido directamente después de la etapa de diafiltración sobre una membrana que tiene un umbral de corte de 10 kDa, o el obtenido después de la etapa de diafiltración esterilizante, o el extracto de hojas de tabaco liofilizado y después reconstituido por ejemplo en un suero fisiológico o en agua.

Ventajosamente, el ajuste de la concentración en la etapa b se puede llevar a cabo:

- ya sea por dilución con agua con el fin de reducir la concentración de proteínas,
- o por diafiltración con el fin de aumentar la concentración de proteínas.

Un excipiente farmacéuticamente aceptable particularmente preferido en la etapa c es agua.

Los adyuvantes que se pueden añadir a la etapa d pueden ser en particular los agentes hinchantes tales como por ejemplo un azúcar tal como lactosa, sacarosa, trehalosa, sorbitol, glucosa, rafinosa, manitol, preferiblemente lactosa, sacarosa, trehalosa, glucosa o manitol, un aminoácido tal como arginina, glicina o histidina, preferentemente glicina, o polímeros de tipo dextrano o polietilenglicol, o sus mezclas.

Según un ejemplo particular, la etapa d comprende al menos la adición de manitol.

Kit que comprende la composición farmacéutica que comprende el extracto de hojas de tabaco

En un sexto aspecto, se describe aquí un kit que comprende dosis de extracto de hojas de tabaco o de composición farmacéutica como se describen anteriormente.

Según un primer ejemplo, el kit comprende una o más dosis de extracto de hojas de tabaco, preferiblemente en forma liofilizada, así como una o más dosis de suero fisiológico o agua PPI para preparar la composición farmacéutica justo antes de la administración.

Según otro ejemplo, el kit comprende una o más dosis de composición farmacéutica listas para ser administradas al paciente.

El kit puede comprender eventualmente una o más jeringas para administrar la composición farmacéutica mediante inyección subcutánea.

El kit puede eventualmente comprender uno o más parches a fin de administrar la composición farmacéutica por vía transdérmica.

Los ejemplos que siguen pretenden ilustrar la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de un extracto de hojas de tabaco según la invención

Se usan hojas de tabaco Burley para preparar el extracto.

Se trituran 100 g de hojas de tabaco Burley secadas por secado natural durante aproximadamente tres meses (en el centro de Francia, entre septiembre y diciembre). El triturado se pone en suspensión durante 24 h a una temperatura de 4 a 10°C en 1892 g de agua PPI a la que se han añadido 8 g de bicarbonato de amonio. A continuación, se eliminan los residuos sólidos en suspensión mediante filtración Büchner.

A continuación, se lleva a cabo una filtración clarificante a 0,2 µm del extracto. El extracto obtenido es de color marrón. Se pesa entonces el extracto a fin de determinar el volumen de agua PPI a usar durante la etapa de diafiltración a volumen constante, la masa del extracto líquido es entonces de 1680 g.

A continuación, se lleva a cabo una extracción proteica de este extracto de triturado de hojas de tabaco secas y sin residuos sólidos: se añaden entonces 10.080 g de agua PPI al extracto de triturado de hojas de tabaco secas sin residuos sólidos. Los 11.760 g de disolución así obtenidos se diafiltran a volumen constante frente a 6 veces el volumen con un umbral de corte de 10 kDa (MerckMillipore) hasta que la masa del retenido se reduce a 1680 g.

El retenido obtenido después de la diafiltración constituye una mezcla de proteínas en la que se detectan proteínas con una masa molecular inferior a 10 kDa con una concentración de 99 % inferior a su concentración inicial. El color del retenido obtenido está situado entre B2 y B3 según la escala de medida de la FARMACOPEIA EUROPEA 5.0, 2.2.2, Degree of coloration of liquids.

Este diafiltrado se puede liofilizar, después de la adición de manitol por ejemplo, usando, por ejemplo, un liofilizador SMH 150, para obtener un extracto de hojas de tabaco liofilizado.

Ejemplo 2: Determinación de la composición proteica del extracto de hojas de tabaco preparado según el Ejemplo 1

Las proteínas del extracto de hojas de tabaco del Ejemplo 1 se separan previamente sobre un gel de poliacrilamida. Para ello, el extracto a analizar se añade a un gel NuPage® Bis-Tris (4-12 %) y se lleva a cabo la electroforesis a 200 V durante 35 min, antes de ponerlo en contacto con 20 mL de Instant Blue durante 1 h y después aclarado con agua durante una noche. Las bandas de gel de poliacrilamida seleccionadas se escisan (6 bandas) y después se decoloran con tampón NH₄CO₃ 50 mM/CH₃CN (50/50). Los puentes disulfuro se reducen entonces con una disolución de ditiotreitolo 10 mM/NH₄CO₃ 50 mM durante 40 min a 55°C. Las cisteínas reducidas se alquilan entonces con una disolución de yodoacetamida 100 mM/NH₄CO₃ 50 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.

La disolución proteica así obtenida se digiere mediante una enzima a fin de obtener fragmentos de proteínas o de péptidos: la digestión se lleva a cabo con tripsina (tripsina V5111 de Promega) en una cantidad adecuada para la coloración de las bandas de gel de poliacrilamida en una disolución NH₄CO₃ 50 mM durante una noche a 37°C.

Los péptidos del digesto de péptidos se separan entonces mediante nanocromatografía líquida (dispositivo U3000 nanoLC system de ThermoFisher Scientific) con preconcentración en C18 PepMap micro-precolum (5 µm; 100 Å; 300 µm x 5 mm; ThermoFisher Scientific) y después elución en C18 PepMap nanocolumn (3 µm; 100 Å; 75 µm x 250 mm; ThermoFisher Scientific) en modo de gradiente lineal; tampón A 0,1 % HCOOH en H₂O/CH₃ (95/5), tampón B 0,1 % HCOOH en H₂O/CH₃CN (20/80), gradiente 0 a 60 % B en 60 min, caudal de 300 µl/min).

Los péptidos se analizan entonces mediante espectrometría de masas en un instrumento LTQ Velos (Dual Pressure Linear Ion Trap; ThermoFisher Scientific) equipado con una fuente nanospray (ThermoFisher Scientific) y acoplado al dispositivo U3000 nanoLC. Los datos se adquieren con el software Excalibur 2.1 (ThermoFisher Scientific) en modo positivo mediante un ciclo de un escaneo MS de m/z 400 a 1600 en modo "Resolution Enhanced" seguido de escaneos MSMS en modo "Resolution Normal" en los 20 iones MS más intenso (carga 2 y más) en modo CID bajo helio con una energía de colisión de 35 eV. Los iones MS previamente fragmentados se excluyen dinámicamente durante 30 s con una tolerancia de masa de 50 mmu.

Las masas de los péptidos y de sus fragmentos se comparan con los datos existentes en las bases de datos a fin de poder identificarlos. Para ello, los datos MS y MSMS se procesan con el software ProteomeDiscoverer 1.4 según el algoritmo de búsqueda MASCOT (Versión 2.4) y se consulta la base de datos UniprotKB/Swiss-Prot (release abril de 2015) reducida a las especies TOBAC.

La identificación de proteínas se valida según el valor de confianza p inferior a 0,05. Sólo se conservan las proteínas identificadas con al menos 2 péptidos de máxima confianza.

Las puntuaciones de cada proteína así identificada sólo permiten una clasificación relativa de las proteínas entre ellas, estando correlacionada esta clasificación con las concentraciones de estas proteínas. Los valores absolutos de estas puntuaciones dependen de las condiciones de trabajo, de la toma de muestreo y de las cantidades depositadas.

La lista de 12 proteínas así identificadas y clasificadas en orden descendente de sus puntuaciones (de la más presente a la menos presente) es la siguiente:

- P36401; E13H_TOBAC; Glucano endo-1,3-beta-glucosidasa, isoforma ácida PR-Q' (EC 3.2.1.39) ((1->3)-beta-glucano endohidrolasa) ((1->3)-beta-glucanasa) (Beta-1,3-endoglucanasa) (PR-35); MM: 36995 Da
- 5 • P17513; CHIP_TO BAC; Endoquitinasa P ácida (EC 3.2.1.14) (Proteína P relacionada con la patogénesis) (PR-P); MM: 27469 Da
- P17514; CHIQ_TOBAC; Endoquitinasa Q ácida (EC 3.2.1.14) (Proteína Q relacionada con la patogénesis) (PR-Q); MM: 27633 Da
- 10 • P27666; E13F_TOBAC; Glucano endo-1,3-beta-glucosidasa, isoforma vacuolar básica GLB (EC 3.2.1.39) ((1->3)-beta-glucano endohidrolasa) ((1->3)-beta-glucanoasa) (Beta-1,3-endoglucanasa, básica) (Glucanasa GLB); MM: 40443 Da
- 15 • P14170; OSMO_TOBAC; Osmotina; MM: 26681 Da
- P24091; CHI2_TOBAC; Endoquitinasa B (CHN-B) (EC 3.2.1.14); MM: 34721 Da
- 20 • P11965; PERX_TOBAC; Peroxidasa aniónica formadora de lignina (EC 1.11.1.7) (TOPA); MM: 34674 Da
- P13046; PRR1_TOBAC; Forma principal de la proteína R relacionada con la patogénesis (proteína E22 similar a la taumatina); MM: 24667 Da
- 25 • P29062; PR4A_TOBAC; Proteína PR-4A relacionada con la patogénesis; MM: 16221 Da
- Q03199; IPIB_TOBAC; Inhibidor de proteinasa IB (PI-IB) (Inhibidor de la isoforma principal de serina proteinasas microbianas); MM: 11916 Da
- 30 • Q03198; IPIA_TOBAC; Inhibidor de proteinasa IA (PI-IA) (Inhibidor de la isoforma menor de serina proteinasas microbianas); MM: 11880 Da
- P29063; PR4B_TOBAC; Proteína PR-4B relacionada con la patogénesis; MM: 16235 Da

35 El procedimiento de preparación del extracto de hojas de tabaco permite por lo tanto concentrar determinadas proteínas y eliminar otras. Así, entre las 759 proteínas de la especie *Nicotiana tabacum* listadas en Swissprot, sólo 6 familias y 12 proteínas están presentes predominantemente en el extracto de hojas de tabaco preparado según el Ejemplo 1. Las 12 proteínas presentes predominantemente en el extracto de hojas de tabaco preparado según el Ejemplo 1 tienen una masa molecular comprendida entre 10 y 50 kDa.

40 **Ejemplo 3: determinación del contenido de proteínas**

El contenido de proteína en el extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 (antes y después de la etapa de diafiltración) se determinó según el método de Bradford. El extracto del Ejemplo 1 se disuelve en suero fisiológico.

45 Se prepararon tres disoluciones estándar de proteínas: Se diluyen 50 µl de una disolución de albúmina sérica bovina de 2 mg/ml (Sigma Aldrich, referencia P0834) 20 veces con 950 µl de suero fisiológico a fin de obtener disoluciones estandarizadas a exactamente 100 µg/ml.

50 Cada tubo ensayado incluye 80 µl de muestra de proteína y 920 µl de reactivo de Bradford (Sigma Aldrich referencia B6916). Después de añadir el reactivo de Bradford a cada tubo, los tubos se agitan suavemente para observar un vórtice y después se incuban durante 5 min a temperatura ambiente. Las muestras se transfieren a cubetas de 1,5 ml y se mide su absorbancia a 595 nm durante 1 h.

55 La concentración de proteínas se determinó por comparación con las disoluciones de proteínas estándar preparadas.

Las cantidades de proteínas medidas son:

- antes de la diafiltración: 295,45 +/- 9,91 µg/ml
- 60 • después de la diafiltración: 160,61 +/- 1,31 µg/ml.

El perfil electroforético del extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 se determinó después de la etapa de diafiltración. Se depositaron cantidades de 2, 5, 10 y 15 µg de proteínas sobre un gel NuPage.

El gel Nupage 4 %-12 % se preparó durante 35 minutos, después se puso en 20 ml de Azul de Commassie durante 1 h y se aclaró con agua durante una noche. El gel se analizó usando el sistema ChemiDoc™ XRS de Biorad con el software Image Lab™.

- 5 Se detectan tres bandas principales alrededor de 15 kDa y 30 kDa (Fig. 1). También se pueden percibir otras dos bandas alrededor de 40 kDa.

10 Los resultados muestran que la cantidad de proteínas con masa molecular superior a 100 kDa detectadas es baja en comparación con la cantidad de proteínas con masa molecular comprendida entre 10 y 50 kDa, en este extracto de hojas de tabaco.

Ejemplo 4: Influencia del volumen de diafiltración sobre la eliminación de moléculas con una masa molecular inferior a 10 kDa en un extracto de hojas de tabaco según la invención

- 15 La eliminación de moléculas con un peso molecular inferior a 10 kDa en el extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 se siguió durante la etapa de diafiltración según el volumen de diafiltración usado. El seguimiento se lleva a cabo mediante dosificación por cromatografía de gases de un trazador analítico (nicotina) con una masa molecular inferior a 10 kDa.

- 20 Los resultados se dan en la siguiente tabla:

Muestras en función del volumen de diafiltración	Área de pico del trazador analítico	Porcentaje de trazador analítico restante
Antes de la diafiltración	54913	100 %
Diafiltración x3 volumen	2630	4,79%
Diafiltración x4 volumen	809	1,47%
Diafiltración x5 volumen	247	0,045%
Diafiltración x6 volumen	NQ	NQ

- 25 La eliminación de las moléculas con un peso molecular inferior a 10 kDa es cada vez más eficaz cuando aumenta el volumen de diafiltración y es total cuando este volumen de diafiltración es 6 veces el volumen inicial.

Ejemplo 5: actividad biológica del extracto del Ejemplo 1 *in vitro* sobre células mononucleadas humanas e *in vivo* sobre ratones

Materiales y métodos:

- Productos utilizados

PMA/Ionomicina (referencia P8139/10634 de Sigma-Aldrich)

35 BSA (referencia A7020 de Sigma Aldrich)

PBS (referencia H15-002 de PAA Laboratories)

40 Tween 20 (referencia P1379 de Sigma Aldrich)

IgG anti-ratón de cabra (específica de cadena g) - Fosfatasa alcalina (referencia 1030-04 de SouthernBiotech)

Biotina-anti IgE de ratón (referencia BLE406904 de Biolegend)

45 Estreptavidina - Fosfatasa alcalina (Southern Biotech ref. 7100-04)

- Preparación y modo de estimulación de las células

- 50 Se aislaron células mononucleadas de sangre periférica de diferentes donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad (medio de separación: LMS 1077 PAA Laboratories). Las células mononucleadas obtenidas se estimularon con el extracto según el Ejemplo 1 en diferentes diluciones durante 24 h o 48 h. Los sobrenadantes se recogieron y después se almacenaron a -80°C después de 24 h o 48 h de estimulación para el análisis del perfil de citocinas mediante la técnica Luminex. Después de 24 h de estimulación, las células también se recogieron para análisis fenotípico mediante citometría de flujo.

55

- Análisis fenotípico por citometría

Las células se marcaron en un primer tiempo con un marcador de viabilidad (Dye eFluor 450 (65-0863-14 eBioscience) y después con anticuerpos acoplados directamente a fluorocromos para la detección de diferentes marcadores de membrana. Las poblaciones de linfocitos T y linfocitos B se identificaron con los marcadores CD3 y CD19. Las células NK se detectaron con el marcador NKp46 o la combinación de los marcadores CD56 y CD16 o mediante la expresión de CD56 en ausencia de CD3. A partir de estas poblaciones celulares se llevaron a cabo "gates" para analizar diferentes marcadores de activación (CD69, CD25, HLA-DR).

La lista de anticuerpos usados para el análisis fenotípico mediante citometría se proporciona en la siguiente tabla:

	Clon	Referencia y proveedor
Anti-CD45-Krome Naranja	J.33	A96416; Beckman Coulter
APC anti-CD56	B159	555518; Becton Dickinson
Anti-CD25PC7	M-A251	557741; Becton Dickinson
Anti-CD25 PC5	B1.49.9	IM2646; Beckman Coulter
FITC anti-CD69	FN50	557049; Becton Dickinson
PE anti-CD69	L78	341652; Becton Dickinson
ECD anti-CD3	UCHT1	A07748; Beckman Coulter
APC anti-KpP46	9E2/NKp46	558051; Becton Dickinson
FITC anti-CD19	H1B19	11-0199-42; eBioscience
Anti-HLA-DR PE	G46-6	347401; Becton Dickinson

Se usaron controles de isotipo en cada experimento y se llevó a cabo una matriz de compensación para este análisis fenotípico multiparamétrico.

Las muestras marcadas se analizaron en un citómetro Navios (Beckman Coulter 10 colores) con una adquisición de un mínimo de 100.000 eventos por tubo. Los datos adquiridos se analizaron entonces sobre el software Kaluza.

- Análisis del perfil de secreción de citocinas mediante Luminex y ELISA

Esta tecnología basada en principios de la técnica ELISA y citometría permite la determinación de varios analitos simultáneamente.

Las microperlas que poseen un código de color único se acoplan a anticuerpos de captura específicos para cada analito. Después de la incubación con las muestras a determinar, los anticuerpos de detección acoplados a un fluorocromo permitirán el análisis mediante un sistema óptico de dos láseres (Bio-plex 200 system Bio-rad). El primer láser permite la identificación de la microperla y el segundo permite la cuantificación de los anticuerpos de detección acoplados al fluorocromo. Se pueden medir 17 analitos con el kit Bio-Plex Pro Human Cytokine Grp1 panel 17 plex (Bio-rad) sobre muestras tomadas durante los diversos experimentos de estimulación llevados a cabo en las células. Las células estimuladas por el medio de cultivo sin extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 permiten obtener el nivel basal para cada citocina.

ELISA IL-8 se basa en una técnica clásica de sándwich inmunoenzimático. Los kits comerciales utilizados se adquirieron de Eurobio-Diaclone (Besançon).

- Inmunización de ratones con el extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1

Se adquirieron ratones hembra C57BL/6 y Balb/c de 7 semanas de edad de Charles River (L'Arbresles, Francia). Los ratones fueron inmunizados a D0 y D21 por vía intraperitoneal con 200 µl del extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1, se liofilizaron y después se reconstituyeron en 5 ml de suero fisiológico. Se extrajo sangre de ratón de todos los ratones antes y después de la inmunización. Después de la centrifugación, el suero se congeló a -20°C.

- ELISA IgG e IgE

Para el experimento ELISA, se reconstituyó un vial del producto con 2,5 ml de tampón carbonato-bicarbonato (0,1 M, pH 9). Se incubaron placas Nunc Maxisorb 96W con 100 µl del extracto de hojas de tabaco liofilizado según el Ejemplo 1, después se reconstituyeron, y se dejaron incubar durante 18 h. Después de lavar las placas en tampón PBS-Tween al 0,05 %, las placas se saturan con 200 µl de tampón PBS-BSA al 1 % durante una hora a temperatura ambiente.

Después de lavar las placas en tampón PBS-Tween al 0,05 %, se incuban 100 µl de suero de ratón, diluidos 1/20 en PBS-BSA al 1 %, durante 2 horas a temperatura ambiente.

Elisa IgG:

Después de lavar en tampón PBS-Tween 20, se incuban 100 µl de un anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra acoplado a fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology ref. 1030-04) y diluido en PBS-BSA al 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar en PBS-Tween al 0,05 %, se añaden 100 µl del sustrato de fosfatasa p-nitrofenilfosfato (pNPP de Sigma) de la fosfatasa alcalina, y se deja durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se detiene entonces la reacción añadiendo 50 µl de NaOH 3 M y se leen las densidades ópticas (DO) a 405 nm.

Elisa IgE

Después de lavar en tampón PBS-Tween 20, se incuban 100 µl de un anticuerpo secundario IgE anti-ratón de rata acoplado a biotina (Biolegend ref. BLE406904) y diluido en PBS-BSA al 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado en PBS-Tween 0,05 %, se añaden 100 µl de estreptavidina acoplada a fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology ref. 7100-04) y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente (dilución 112000 en PBS-BSA 1 % según las recomendaciones del proveedor). Después de lavar de nuevo en PBS-Tween al 0,05 %, se añaden 100 µl del sustrato pNPP de fosfatasa alcalina y se deja durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se detiene entonces la reacción añadiendo 50 µl de NaOH 3 M y se leen las densidades ópticas (DO) a 405 nm.

Resultados:

- El extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 provoca una respuesta humoral específica de tipo IgG en ratones.

Después de 2 inmunizaciones de ratones con el extracto de hojas de tabaco liofilizado según el Ejemplo 1 y después reconstituido en 5 ml de suero fisiológico, se observó una inducción de IgG frente a los componentes del producto. Así, 4/5 ratones C57BL/6 y 4/5 ratones Balb/c han mostrado un aumento de su IgG contra el extracto de hojas de tabaco a D28, es decir, 7 días después de la 2ª vacunación (Fig. 2). El único ratón de cada grupo que no respondió tenía niveles basales de anticuerpos de tipo IgG. Los títulos de anticuerpos aparecen más bajos en ratones Balb/c que en ratones C57BL/6 (Fig. 2).

Por el contrario, no se detectó ninguna respuesta humoral de tipo IgE después de 2 vacunaciones de los ratones con el extracto de hojas de tabaco. Las densidades ópticas (DO) fueron inferiores a 0,05 en todas las determinaciones realizadas en los diferentes sueros.

- El extracto de hojas de tabaco activa preferentemente las células Natural Killer en la sangre periférica

Después del aislamiento de las células mononucleadas de la sangre periférica mediante gradiente de densidad (Ficoll), se pueden caracterizar diferentes poblaciones celulares (linfocitos T y B, células NK, etc.) (Fig. 3). Así, las células NK se identificaron mediante los marcadores CD56 y CD16 en la población CD3 negativa o mediante el marcador NKp46. Después de la incubación de las células mononucleadas con el extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1, se observó un aumento en la expresión de los marcadores de activación CD69, CD25 y HLA-DR en las células NK tanto identificadas por los marcadores CD16 +CD56+ (CD3-) (Fig. 4A) como por el marcador NKp46 (Fig. 4B). Los resultados son más marcados con el extracto de hojas de tabaco diluido al 1/2 y para la expresión de CD69. Así, más del 60 % de las células NK expresan el marcador CD69, 24 horas después de la puesta en contacto con el extracto de hojas de tabaco (Fig. 4A-B). En reposo, menos del 5 % de las células NK en la sangre expresan CD69.

El efecto del extracto de hojas de tabaco sobre la activación de los linfocitos de la sangre periférica es mucho más débil. Así, en reposo, el 2 % de los linfocitos T expresan CD69 y esta expresión aumenta al 6 % después de 24 horas de cultivo con extracto de hojas de tabaco (Fig. 5A). La expresión de CD25 no aumenta en los linfocitos T sensibilizados con el extracto de hojas de tabaco (Fig. 5A). Asimismo, sobre los linfocitos B de la sangre periférica, el extracto de hojas de tabaco no tiene actividad significativa, ya que menos del 3 % de los linfocitos B expresan CD69 después de 24 horas de cocultivo con este extracto (Fig. 5B).

- Perfil de citocinas inducido por el extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 sobre células mononucleadas de la sangre humana

Se pusieron en contacto células mononucleadas de la sangre periférica durante 24 horas con el extracto de hojas de tabaco liofilizado según el Ejemplo 1, después se reconstituyeron con 5 ml de PBS a diferentes diluciones (1/2 o 1/20), y se llevaron a cabo determinaciones de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por Luminex en el sobrenadante.

La Figura 6 muestra una inducción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-17) importantes por el extracto de hojas de tabaco. Así, los niveles basales de estas citocinas cuando las células mononucleares no se ponen en presencia del extracto de hojas de tabaco son inferiores a 10 pg/ml (Fig. 6A).

Las concentraciones de citocinas IL-1B, IL-6 y TNF α se miden en más de 1000 pg/ml después de la incubación con el extracto de hojas de tabaco diluido al 1/2 (Fig. 6A). Esta clara inducción de citocinas proinflamatorias también se observa cuando el extracto de hojas de tabaco se diluye al 1/20 (Fig. 6A). Los resultados son bastante homogéneos entre los diferentes donantes ensayados. Entre las citocinas TH1 (IL-2, IFN γ , IL-12) que favorecen una inmunidad a medicación celular, sólo IFN γ se estimula significativamente con el extracto de hojas de tabaco diluido al 1/2 y al 1/20 (Fig. 6B). El extracto de hojas de tabaco induce concentraciones muy bajas de citocinas TH2 (IL-4, IL-5, IL-13) del orden de unos pocos pg/ml (Fig. 7A). Por el contrario, el extracto de hojas de tabaco estimula la producción de IL-10 por las células mononucleadas con porcentajes de 750 pg/ml encontrados en el sobrenadante de las células puestas en contacto con el extracto de hojas de tabaco diluido a 1/2 (Fig. 7A). La IL-10 se consideró inicialmente una citocina TH2, pero también puede ser producida por linfocitos T reguladores denominados Tr1.

Se ha demostrado que el extracto de hojas de tabaco también podía inducir la producción de factores de crecimiento hematopoyético como G-CSF, que favorece la expansión y el reclutamiento de neutrófilos y quimiocinas como MCP-1, que se sabe que ejerce un efecto quimiotáctico sobre los macrófagos (Fig. 7B). Por otro lado, el extracto de hojas de tabaco no parece estimular significativamente otros factores de crecimiento como IL-7 o GM-CSF (Fig. 7B). Se ha encontrado el mismo perfil de citocinas/quimiocinas cuando los ensayos se llevaron a cabo sobre sobrenadantes recogidos 48 horas después del cultivo con extracto de hojas de tabaco.

Conclusión

El extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 es capaz de inducir una respuesta humoral de tipo IgG específica dirigida contra las proteínas presentes en el producto en dos líneas de ratones de orígenes genéticos diferentes.

No se observó ninguna respuesta humoral de tipo IgE después de dos administraciones del producto en estos mismos ratones.

In vitro, el extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 induce preferentemente la activación de células NK entre las células mononucleares de la sangre periférica. Esta activación se refleja en el aumento de la expresión de las moléculas CD69, CD25 y HLA-DR.

El extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 induce *in vitro* citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 β , IL6, IL-17, IL-8 y TNF α . Estas citocinas están presentes en altas concentraciones en el sobrenadante del cultivo recogido 24 horas después de la estimulación.

El extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 también induce IFN γ , IL-10, G-CSF y MCP-1. Por otro lado, este extracto no induce significativamente la producción de citocinas TH2 (IL-4, IL-5, IL-13).

Ejemplo 6: estudio toxicológico de un extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 Materiales y métodos:

Todos los estudios siguientes se llevaron a cabo con el extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1.

La vía de administración es subcutánea en todos los casos.

Se llevaron a cabo estudios toxicológicos en roedores (ratas Han Wistar).

Los estudios toxicológicos se llevaron a cabo según los principios de la OCDE en materia de buenas prácticas de laboratorio (Aceptación Mutua de Datos (AMD) en la evaluación de datos, 26 de noviembre de 1997 (C(97) 186 Final) y según las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) publicadas por el Ministerio francés de Empleo y Solidaridad (nº 2000/5bis, decreto del 14 de marzo de 2000, DO 23/03/2000).

- Estudio de toxicidad subcutánea a los 14 días

El objetivo de este estudio fue determinar la toxicidad del extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 en ratas después de la administración subcutánea (una vez a la semana durante 2 semanas).

El estudio se llevó a cabo de la siguiente manera:

Grupo nº	Dosis expresada en proteína (µg/kg/adm)	Volumen de dosis (mL/kg/adm)	Concentración de dosis expresada como proteína (µg/ml)	Numero de animales	
				machos	hembras
1	0	2	0	6	6

Grupo nº	Dosis expresada en proteína (µg/kg/adm)	Volumen de dosis (mL/kg/adm)	Concentración de dosis expresada como proteína (µg/ml)	Numero de animales	
				machos	hembras
2	11,2	0,4	28	6	6
3	56	2	28	6	6

Los resultados del estudio mostraron que:

- no se observa ninguna mortalidad, sea cual sea la dosis;
- no se observan signos clínicos relacionados con el tratamiento, y la administración subcutánea es localmente bien tolerada (se observaron signos clínicos y tolerancia local antes y después de la inyección, y una vez al día cuando no se administra ningún tratamiento);
- las consecuencias sobre el peso corporal y el consumo de alimentos (en comparación con los controles) no son perjudiciales;
- la leucocitemia presenta diferencias, entre roedores tratados y no tratados, consideradas biológicamente significativas pero sin efecto tóxico;
- se observaron variaciones entre el grupo tratado y el no tratado con respecto a las concentraciones de proteína y colesterol, pero estas variaciones se mantuvieron dentro o cerca de las del grupo de control. Estos efectos no son perjudiciales;
- no se observó ninguna modificación en el peso de los órganos entre el grupo tratado y el grupo de control.

Por lo tanto, la administración subcutánea a ratas Wistar del extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 una vez por semana durante 2 semanas a dosis de 11,2 y 56 µg de proteína/kg/adm fue bien tolerada.

- Estudio de toxicidad subcutánea durante 4 semanas

El objetivo fue determinar la toxicidad del extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 después de su administración subcutánea una vez por semana a ratas Wistar y determinar la regresión de cualquier signo de toxicidad durante un período de 4 semanas sin tratamiento.

Se prestó especial atención a los posibles fenómenos inmunológicos. El estudio se llevó a cabo de la siguiente manera:

Grupo/tratamiento	Dosis ⁽¹⁾ (µg/kg / adm)	Volumen de dosis (ml/kg / adm)	Concentración de dosis (µg/ml)	Numero de animales			
				Después del tratamiento ⁽²⁾		Después del período de observación ⁽³⁾	
				machos	hembras	machos	hembras
1. Control (vehículo: 0,9 % NaCl)	0,0	4,0	0,0	10	10	5	5
2. dosis baja	16,8	0,6	28,0	10	10	/	/
3. dosis intermedia	33,6	1,2	28,0	10	10	/	/
4. dosis alta	112,0	4,0	28,0	10	10	5	5

(1) Expresado en proteínas

(2) Ratras sacrificadas 2 días después de la última administración (día 23)

(3) Ratras sacrificadas 4 semanas después de la última administración (día 49)

- 35 Durante el período de tratamiento, se observaron las ratas antes y al menos 3 veces después de la administración. Durante el período de observación, las ratas se observaron una vez al día.

Se llevó a cabo un examen clínico completo una vez por semana. La tolerancia local se anotó antes y después de cada inyección, una vez al día durante la primera semana y después dos veces por semana hasta el final del período de observación.

5 La temperatura corporal se midió el día después de cada administración (días 1, 8, 15 y 22).

Se llevaron a cabo exámenes oftalmológicos antes del ensayo, así como un día después del primer y del último día de administración (días 1 y 22).

10 El peso corporal individual y el consumo de alimentos se midieron 2 veces por semana.

Los análisis hematológicos, de coagulación, de parámetros de química clínica sérica y de linfocitos se llevaron a cabo los días 23 y 49/48 (macho/hembra respectivamente). Los análisis de orina se llevaron a cabo el día 23.

15 Todos los animales fueron sacrificados 2 días después de la última administración o después de un período de observación de 4 semanas y se les realizó la autopsia. Algunos órganos fueron pesados y utilizados para exámenes histopatológicos.

Los resultados del estudio mostraron que:

- 20
 - no se observa ninguna mortalidad, sea cual sea la dosis;
 - la administración subcutánea en dosis expresadas en proteínas de 16,8, 33,6 y 112,0 µg/kg/adm fue bien tolerada localmente;
- 25
 - no se observan ningún signos clínicos relacionados con el tratamiento;
 - la temperatura corporal no se ve afectada;
- 30
 - no se observó ningún impacto oftalmológico relacionado con el tratamiento;
 - el peso corporal y el consumo de alimentos no se ven afectados;
 - no se observaron diferencias significativas en lo que se refiere a la hematología, la coagulación y la orina;
- 35
 - la actividad enzimática de la creatina-quinasa disminuyó en los grupos 3 y 4 de hembras (dosis intermedia y alta; 33,6 y 112 µg/kg/adm respectivamente) al final del período de tratamiento. Estas variaciones no se consideraron como perjudiciales en la medida que no estaban asociadas con características histopatológicas;
- 40
 - una ligera disminución en el número de células NK circulantes en hembras tratadas y en machos tratados con dosis intermedias y altas (grupos 3 y 4);
 - al final del período de observación, el valor medio del número de células NK circulantes en los machos tratados con dosis altas (grupo 4) fue menor;
- 45
 - no se observó ningún cambio en el peso de los órganos;
 - se observó una mancha oscura a nivel del lugar de la inyección, lo que corresponde a hemorragias subcutáneas durante la evaluación histopatológica. Esta observación se considera como no relacionada con el procedimiento de administración.
- 50

Al final del tratamiento, se observaron cambios inflamatorios cutáneos mínimos o leves en el lugar de la inyección en los grupos 3 y 4, mientras que casi no se observaron ningún cambio inflamatorio para los grupos 1 y 2.

55 Al final del período de observación, los cambios inflamatorios observados previamente para el grupo 4 mostraron una recuperación casi completa.

Las 4 inyecciones subcutáneas del extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1, hasta una dosis de 112 µg/kg/adm, fueron bien toleradas y sólo aparecieron cambios inflamatorios mínimos y reversibles en las ratas tratadas en comparación con las ratas no tratadas.

60 En conclusión, en las condiciones experimentales definidas anteriormente, la administración subcutánea en ratas Wistar del extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1 una vez por semana durante 4 semanas, a dosis de 16,8, 33,6 y 112 µg/kg/adm, fue bien tolerada y no se asoció con ningún efecto indeseable.

65

Ejemplo 7: estudio clínico después de la administración de un extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1

Una composición farmacéutica que comprende el extracto de hojas de tabaco según el Ejemplo 1, que contiene 100 µg o 200 µg de proteínas y manitol, se administró mediante inyección subcutánea una primera vez a D0 y una segunda vez un mes después a D29 (1 ml en cada brazo cada vez) a 24 fumadores. Las inclusiones se llevaron a cabo siguiendo el principio de expansión de cohortes, incluyéndose primero los primeros 6 pacientes que recibieron 100 µg, seguidos por los primeros 6 pacientes que recibieron 200 µg, antes de la inclusión de 6 pacientes adicionales que recibieron 100 µg. La población de sujetos tratados estuvo constituida por 24 personas, 14 hombres y 10 mujeres, con edades comprendidas entre 30 y 65 años con promedio de edad de 44,5 años.

Cabe señalar que ninguna de las dosis ensayadas generó toxicidad de nivel 3-4 según los grados de toxicidad de la clasificación Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v 4.0 del National Cancer Institute.

Las características iniciales de los sujetos en materia de consumo de tabaco se muestran en la siguiente tabla.

	N	%	Mediana	Extendida
Estado del consumidor				
Fumador	24	100		
Consumo				
Cigarrillos manufacturados, N°/D		18	75	20 (15; 30)
Cigarrillos liados, N°/D		3	12,5	20 (15; 30)
Cigarrillos, N°/D		3	12,5	20 (15; 20)
Nivel de dependencia de Fagerstom				
5		11	46	
6		5	21	
7		2	8	
8		3	12,5	
9		3	12,5	
Medida de CO exhalado (ppm)		24		24,5 (9; 45)
¿Le gustaría dejar de fumar?				
No				
Sí		24	100	

Las figuras 8 y 9 muestran la evolución del consumo de tabaco.

La fórmula para calcular la reducción del número de cigarrillos se establece como sigue:

$$\frac{(\text{N}^\circ \text{ de cigarrillos visita } n - \text{N}^\circ \text{ de cigarrillos al momento de la inclusión})}{\text{N}^\circ \text{ de cigarrillos al momento de la inclusión}}$$
Una revisión realizada a las 4 semanas puso en evidencia que 16 fumadores (es decir, el 67 % de los fumadores) habían dejado de fumar o habían reducido su consumo diario de cigarrillos en al menos un 50 %, y que el consumo diario de cigarrillos de los 24 fumadores había disminuido en un 60 %.

Una revisión realizada a las 12 semanas puso en evidencia que 15 fumadores (es decir, el 63 % de los fumadores) habían dejado de fumar o habían reducido su consumo diario de cigarrillos en al menos un 50 %, y que el consumo diario de cigarrillos de los 24 fumadores había disminuido en un 60 %.

Es interesante observar que los últimos 12 fumadores (es decir, 12 de 24) se beneficiaron de un período más largo (a veces de un mes o más) entre su primer contacto con el centro de estudio clínico y la inyección de un extracto de tabaco según el Ejemplo 1, mientras que los primeros 12 fumadores se beneficiaron de un período más corto (a menudo de sólo unos pocos días). Para estos 12 fumadores que se beneficiaron de un período más largo, el porcentaje de fumadores que han reducido su consumo de al menos un 50 % o dejaron su consumo a las 3 y 4 semanas es de 83 % (10 fumadores de 12) mientras que es de 50 % (6 fumadores de 12) para los 12 fumadores que se beneficiaron de un período más corto. Esta mayor efectividad se explica por la mejor preparación de estos fumadores que tuvieron más tiempo para fortalecer su motivación antes de recibir una inyección de un extracto de tabaco según el Ejemplo 1.

De estos últimos 12 fumadores, 5 se abstuvieron continuamente durante una semana después del final del tratamiento hasta la semana 12 (fin del seguimiento) y 8 se abstuvieron continuamente durante los últimos 7 días en la semana 12.

- 5 Los fumadores tratados describen una reducción de su atracción por los cigarrillos y de su deseo de fumar, así como el establecimiento de una cierta indiferencia hacia los cigarrillos. Observan una reducción en la apetencia de los cigarrillos. Algunos hablan de un cambio en el sabor de los cigarrillos. Su motivación para dejar de fumar se ve reforzada.
- 10 Antes de la administración de la composición farmacéutica, se detectaron en todos los pacientes anticuerpos IgG dirigidos contra la composición farmacéutica. Antes del tratamiento, las concentraciones promedio de IgG dirigidas contra la composición farmacéutica eran 6,07 microg/ml (desviación estándar: 2,98 microg/ml).
- 15 Después de la administración de la composición farmacéutica, se observó un aumento significativo en las concentraciones de IgG anti-composición farmacéutica. Así, las concentraciones de IgG medidas 29 días después de la administración de la composición farmacéutica fueron 7,19 microg/ml (desviación estándar: 4,04 microg/ml) y estas concentraciones aumentaron a 7,5 microg/ml (desviación estándar 4,28 microg/ml) cuando se determinaron 8 semanas después de la primera administración de la composición farmacéutica. Las variaciones en las concentraciones de IgG fueron significativas (umbral de significancia de la prueba t $p < 0,05$) entre D29 y D0 ($p = 0,02$) y entre las determinaciones de la semana 8 y a D0 ($p = 0,006$). También se observó una diferencia significativa entre las concentraciones de IgG anti-composición farmacéutica en la semana 8 y a D29 ($p = 0,029$).
- 20 El análisis estadístico que cruza las concentraciones de IgG dirigidas contra la composición farmacéutica y el dejar de fumar puso en evidencia correlaciones (ensayo de Wilcoxon, umbral de significancia $p < 0,05$) entre niveles más elevados de IgG dirigidas contra la composición farmacéutica y el dejar de fumar.
- 25 Los pacientes que redujeron su consumo de al menos 50 % una semana después de la primera administración de la composición farmacéutica tuvieron niveles más altos de IgG dirigidas contra la composición farmacéutica a D29 ($p = 0,034$) y en la semana 8 ($p = 0,044$).
- 30 Los pacientes que estuvieron en abstinencia durante 7 días consecutivos (abstinencia prevalente) a D36 tuvieron niveles más altos de IgG dirigidas contra la composición farmacéutica a D29 ($p < 0,001$) y en la semana 8 ($p < 0,001$).
- 35 Los pacientes que estuvieron en abstinencia durante 7 días consecutivos (abstinencia prevalente) en la semana 12 tuvieron niveles más altos de IgG dirigidas contra la composición farmacéutica a D29 ($p = 0,013$) y en la semana 8 ($p = 0,016$).
- 40 Los pacientes que estuvieron en abstinencia continua hasta la semana 12 tuvieron niveles más altos de IgG dirigidas contra la composición farmacéutica a D29 ($p = 0,007$) y en la semana 8 ($p = 0,009$).
- No se detectaron anticuerpos de tipo IgE después de la administración de la composición farmacéutica.

REIVINDICACIONES

1. Extracto de hojas de tabaco que contiene al menos un 5 % en peso, con respecto al peso total del extracto seco, de proteínas de masa molecular superior a 10 kDa, y esencialmente libre de moléculas de masa molecular de peso inferior a 10 kDa, eligiéndose dichas proteínas preferentemente del grupo formado por las siguientes familias de proteínas: peroxidasa aniónica formadora de lignina, glucano endo-1,3-beta-glucosidasa, endoquitinasa, proteína relacionada a la patogénesis, osmotina e inhibidor de la proteinasa, así como sus mismos; caracterizándose dicho extracto de hojas de tabaco por que:
 - el contenido de proteínas cuya masa molecular es superior a 500 kDa, preferentemente cuya masa molecular es superior a 400 kDa, más preferentemente cuya masa molecular es superior a 300 kDa, de manera preferida cuya masa molecular es superior a 200 kDa, de manera más preferente cuya masa molecular es superior a 150 kDa, de manera más preferente cuya masa molecular es superior a 100 kDa y de manera más preferente aún cuya masa molecular es superior a 50 kDa, es inferior a 15 % en peso con respecto al peso proteico total del extracto, preferentemente inferior a 10 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, más preferiblemente inferior a 7,5 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, preferiblemente incluso inferior a 5 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, de manera preferida inferior a 2,5 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, de manera incluso más preferida inferior a 1 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto, y mejor aún inferior a 0,5 % en peso con respecto al peso total proteico del extracto; y
 - el contenido en moléculas con una masa molecular inferior a 10 kDa es inferior a 5 % en peso con respecto al peso total del extracto, preferentemente inferior a 2,5 % en peso, y mejor aún inferior a 1 % en peso.
2. Extracto de hojas de tabaco según la reivindicación 1, caracterizado por que es susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento de extracción con un disolvente, por ejemplo un disolvente acuoso, de un triturado de hojas de tabaco secas seguido de una separación de los residuos sólidos de la disolución de extracto triturado de hojas de tabaco secas, después de una diafiltración a volumen constante de la disolución de extracto de triturado de hojas de tabaco secas sin residuo sólido con un disolvente acuoso en una cantidad que varía de 2 a 12 veces en volumen, preferiblemente de 3 a 10 veces en volumen, preferiblemente de 4 a 8 veces en volumen, preferiblemente 6 veces en volumen, con respecto al volumen del extracto y con una membrana que tiene un umbral de corte de 10 kDa.
3. Extracto de hojas de tabaco según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que comprende al menos una proteína que pertenece a la familia de las glucano endo-1,3-beta-glucosidasas, y preferentemente elegida entre la isoforma ácida PR-Q' de la beta-1,3-endoglucanasa (PR36401 según la base UniProt), la isoforma vacuolar básica GLB de la beta-1,3-endoglucanasa (P27666 según la base UniProt), y sus mezclas.
4. Extracto de hojas de tabaco según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende al menos una proteína que pertenece a la familia de las endoquitinasas, y preferentemente escogida de la endoquitinasa P ácida (P17513 según la base UniProt) endoquitinasa Q ácida (P17514 según la base de UniProt), endoquitinasa B (P24091 según la base UniProt), y sus mismas.
5. Extracto de hojas de tabaco según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende al menos osmotina (P14170 según la base UniProt).
6. Extracto de hojas de tabaco según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende al menos una peroxidasa aniónica formadora de lignina (P11965 según la base UniProt).
7. Extracto de hojas de tabaco según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende al menos una proteína relacionada a la patogénesis, y preferentemente elegida entre la proteína R relacionada a la patogénesis (P13046 según la base UniProt), la proteína PR-4A relacionada con la patogénesis (PR29062 según la base UniProt), la proteína PR-4B relacionada con la patogénesis (PR29063 según la base UniProt), y sus mezclas.
8. Extracto de hojas de tabaco según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende al menos una proteína que pertenece a la familia de los inhibidores de proteinasa, y preferentemente elegida entre el inhibidor de proteinasa I-B (Q03199 según la base UniProt), el inhibidor de proteinasa I-A (Q03198 según la base UniProt), y sus mismos.
9. Extracto de hojas de tabaco según al menos una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el contenido de proteínas en el extracto seco es de al menos 10 % en peso, preferentemente al menos 15 % en peso, preferentemente al menos 20 % en peso con respecto al peso total del extracto seco.
10. Composición farmacéutica que comprende como principio activo un extracto de hojas de tabaco según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, así como un excipiente farmacéuticamente aceptable.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, caracterizada por que las proteínas presentes en dicho extracto de hojas de tabaco están presentes en una cantidad que oscila de 1 a 1000 µg/ml, preferiblemente de 10 a

500 µg/ml, preferiblemente de 50 a 300 µg/ml, preferiblemente de 60 a 200 µg/ml, preferiblemente entre 80 y 150 µg/ml.

5 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 u 11, caracterizada por que contiene además proteínas extraídas del cannabis.

10 13. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizada por que se presenta en una forma adecuada para una administración mediante inyección subcutánea, o en una forma adecuada para una administración con la ayuda de un sistema terapéutico transdérmico adhesivo tal como un parche, o en una forma adecuada para una administración por pulverización o por vaporización.

14. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, para uso en el tratamiento de la adicción al tabaco, o para uso en el tratamiento conjunto de la adicción al tabaco y al cannabis.

15 15. Composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la adicción al tabaco, o en el tratamiento conjunto de la adicción al tabaco y al cannabis, según la reivindicación 14, caracterizada por que la composición farmacéutica se presenta en una forma de dosificación de 0,03 ml a 10 ml, preferentemente 0,1 ml a 5 ml, preferiblemente de 0,5 a 2 ml.

20 16. Procedimiento para preparar un extracto de hojas de tabaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende las siguientes etapas:

- a. Secar hojas de tabaco,
- b. Triturar hojas de tabaco secas para obtener un triturado de hojas de tabaco secas,
- c. Extraer el material triturado de hojas de tabaco secas bajo agitación mecánica con un disolvente, por ejemplo un disolvente acuoso, preferiblemente una disolución tampón acuosa con un pH comprendido entre 6,0 y 8,5,
- 25 d. Separar los residuos sólidos de la disolución del extracto del triturado de hojas secas de tabaco mediante filtración o centrifugación a fin de obtener una disolución de extracto de triturado de hojas de tabaco secas sin residuo sólido,
- e. Diafiltrar a volumen constante la disolución obtenida en la etapa d con un disolvente, preferentemente un disolvente acuoso, en una cantidad que oscila de 2 a 12 veces en volumen, preferentemente de 3 a 10 veces en volumen,
- 30 preferentemente de 4 a 8 veces en volumen, preferiblemente 6 veces en volumen, con respecto al volumen del extracto, y con una membrana que tiene un umbral de corte de 10 kDa,
- F. Eventualmente, liofilizar la disolución proteica obtenida en la etapa e.

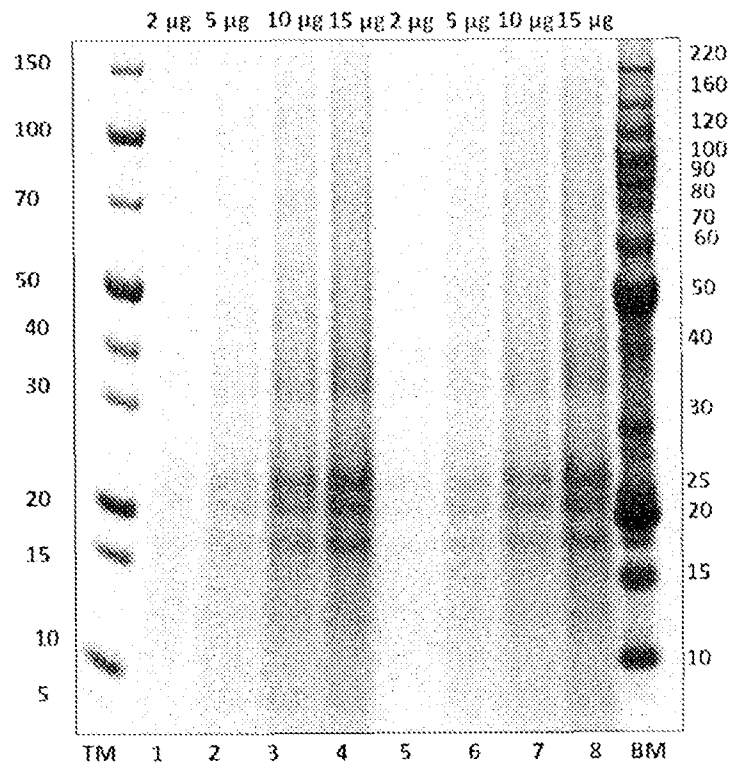


FIGURA 1

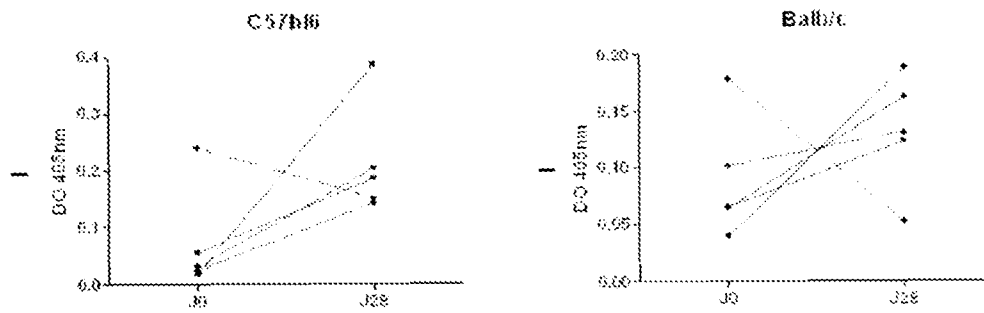


FIGURA 2

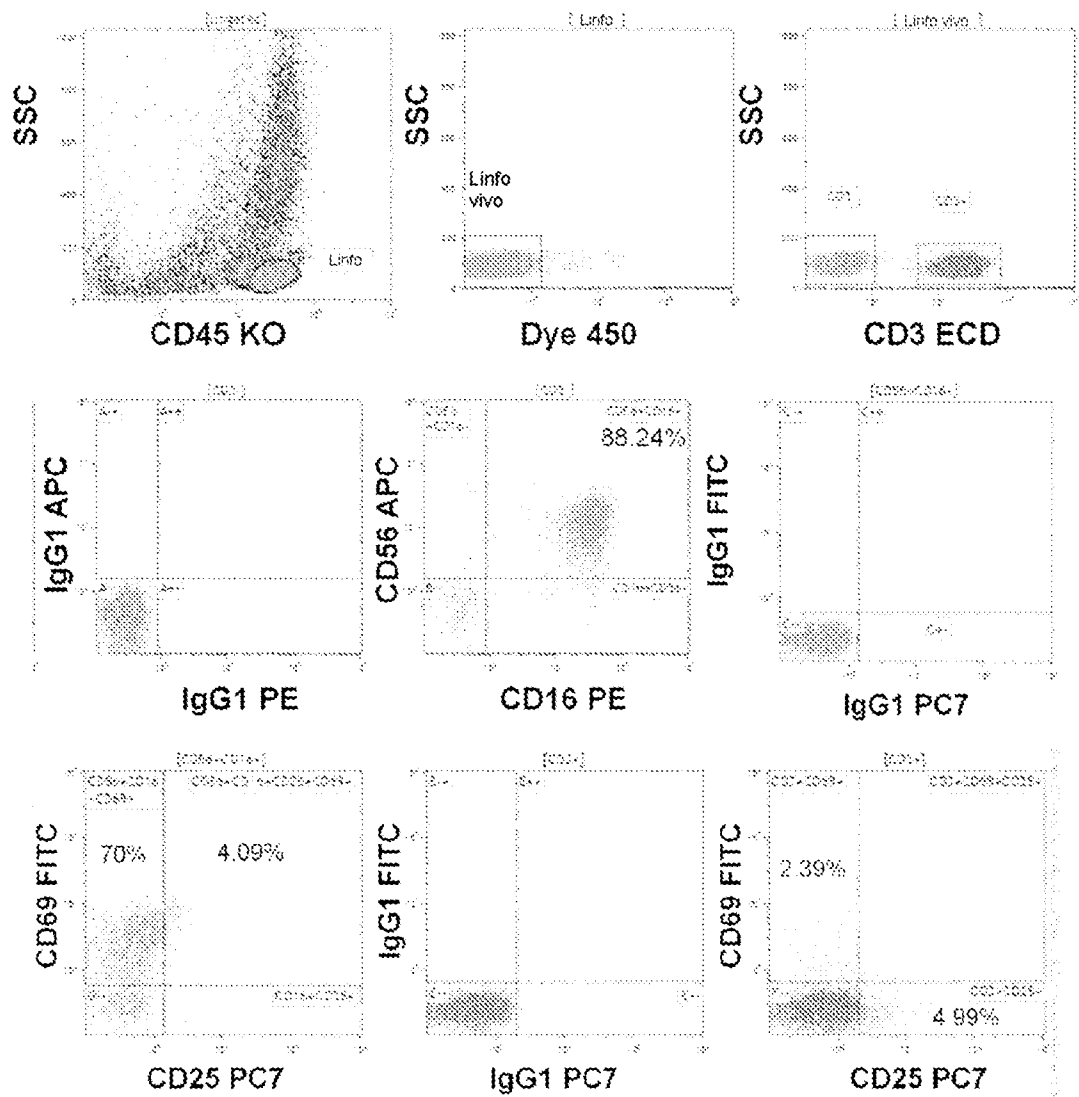


FIGURA 3

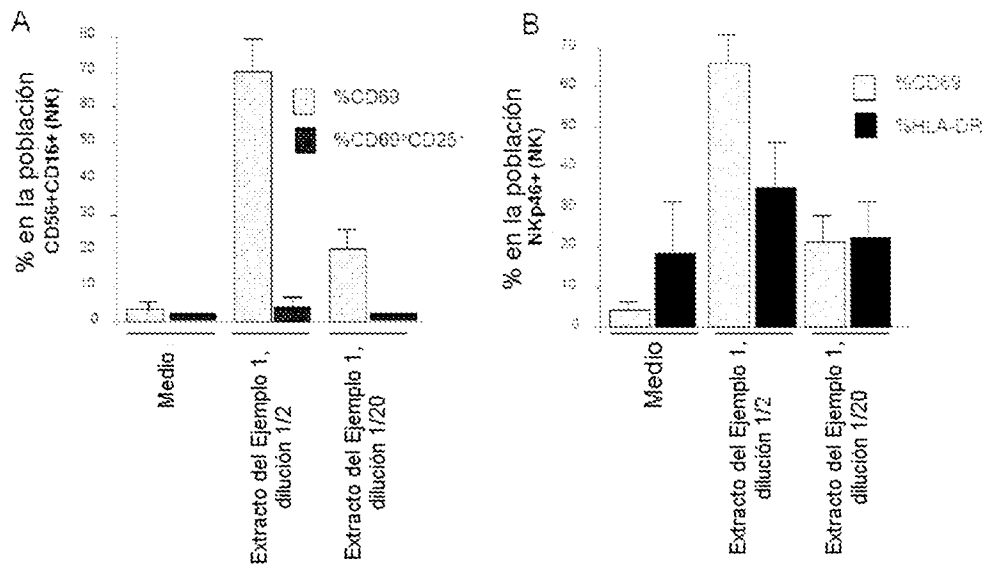


FIGURA 4

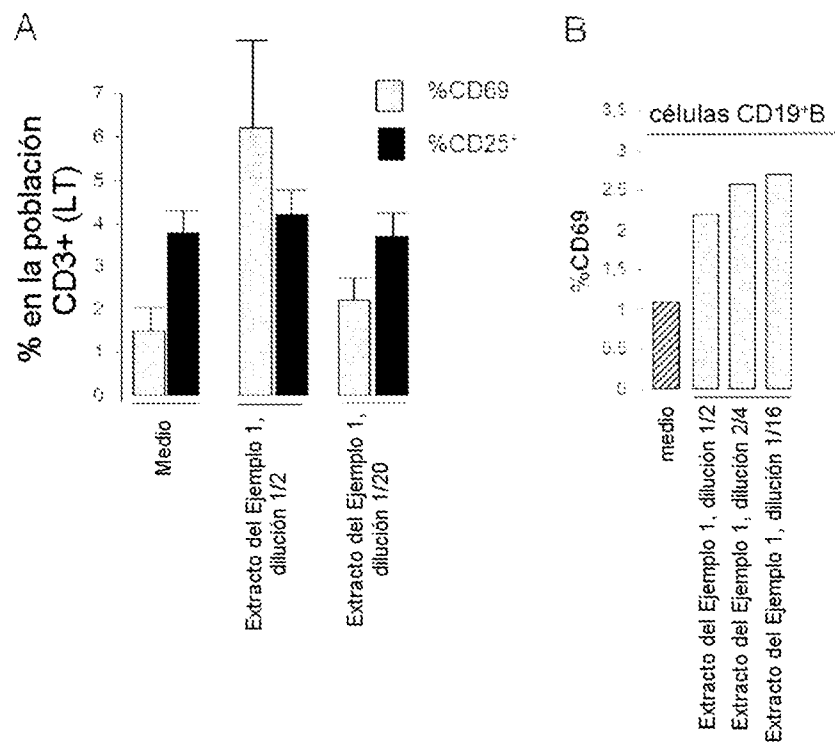


FIGURA 5

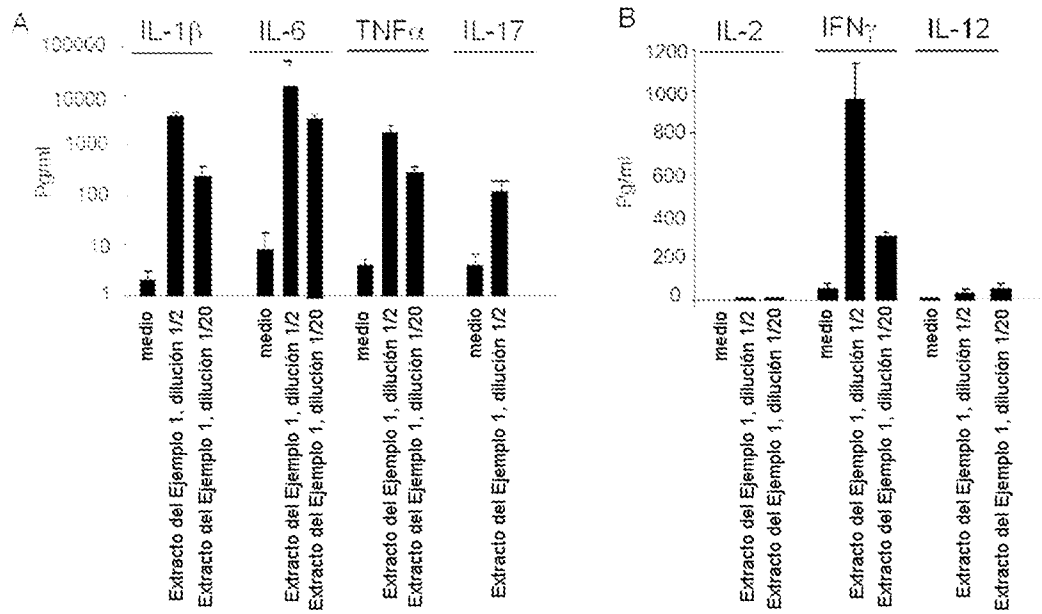


FIGURA 6

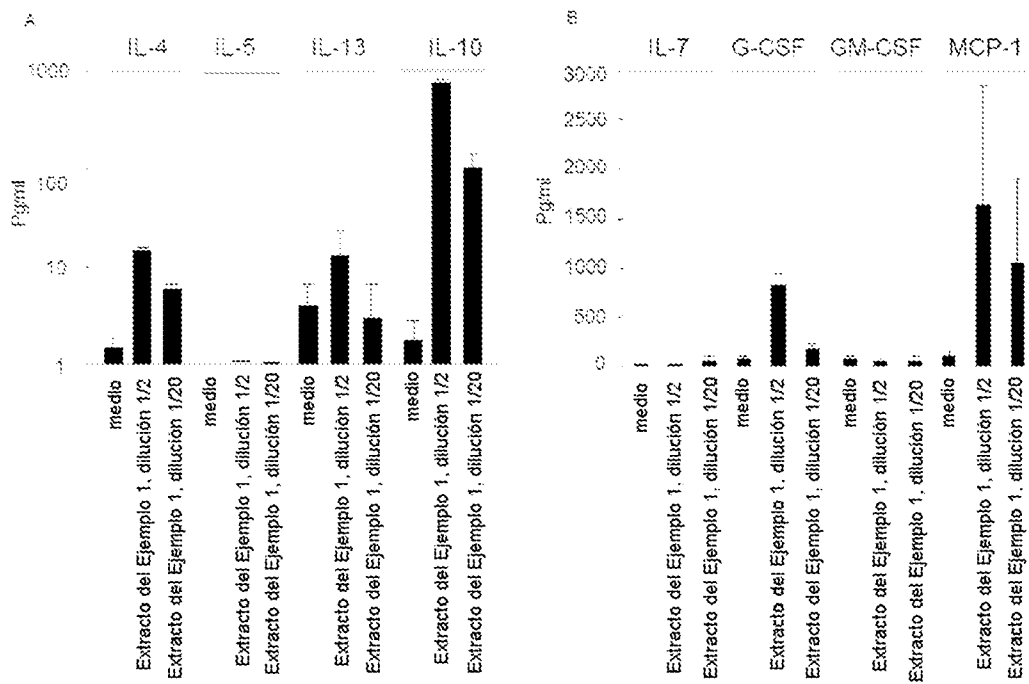


FIGURA 7

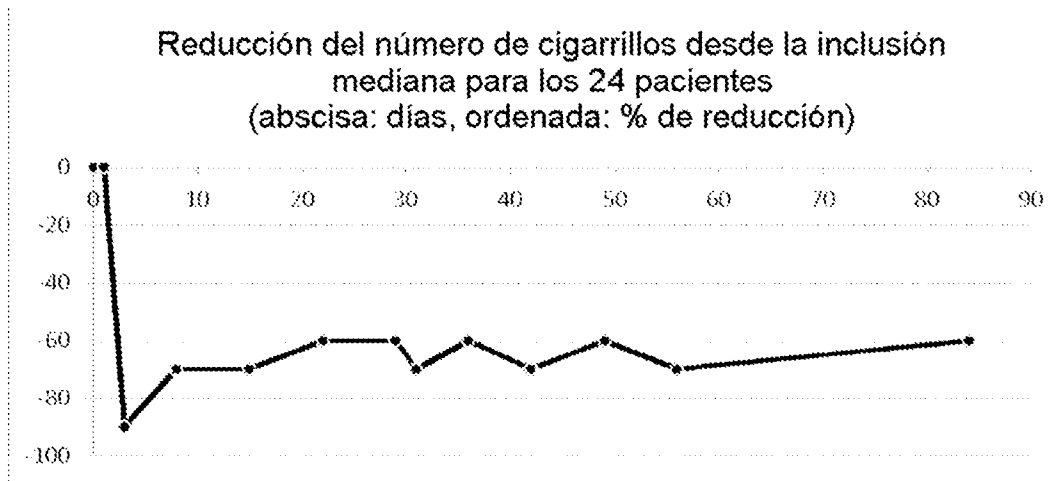


FIGURA 8

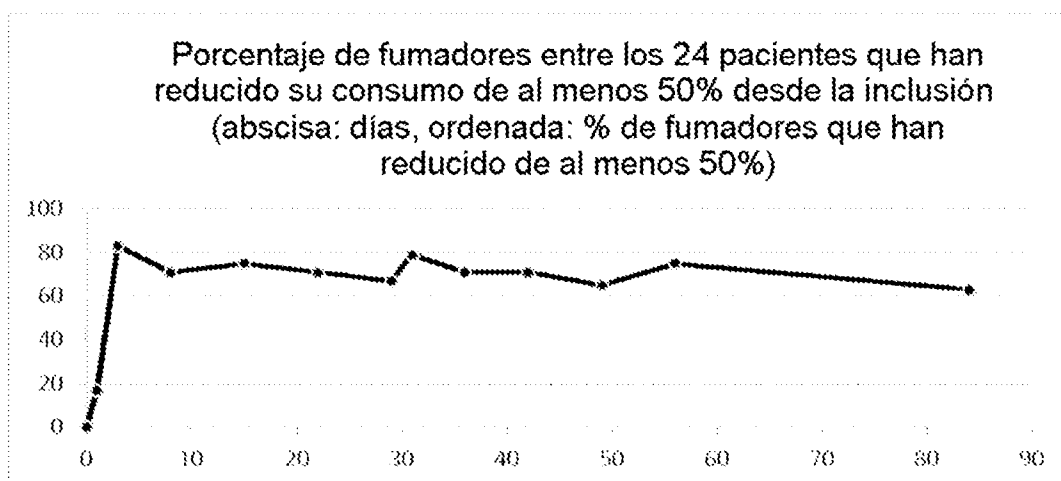


FIGURA 9