



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 302 061**

(51) Int. Cl.:
A61K 36/85 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04804098 .4**
(86) Fecha de presentación : **20.12.2004**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1750735**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

(54) Título: **Uso de un extracto de *Aloysia/Verbena/Lippia triphylla* para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades crónicas y/o inflamatorias.**

(30) Prioridad: **18.12.2003 DE 103 59 384**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

(73) Titular/es: **Anoxymer GmbH**
Scheltztorstrasse 54-56 4
73728 Esslingen a.N., DE

(72) Inventor/es: **Balan, Karim y**
Paper, Dietrich

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 302 061 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

Uso de un extracto de *Aloysia/Verbena/Lippia triphylla* para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades crónicas y/o inflamatoria.

La invención se refiere al uso de un extracto de *Aloysia triphylla* (L'Her.)O. Kuntze/Britt. (syn. *Lippia citriodora* H. B. K., *Lippia triphylla* (L'Her.) O. Kuntze) o un liofilizado del mismo, para la profilaxis química y el tratamiento de enfermedades crónicas. Por otra parte, la presente invención se refiere a un extracto preparado a partir de *Aloysia triphylla*.

Existen diferentes designaciones sinónimos para *Aloysia triphylla* en la literatura: *Aloysia triphylla* (L'Hérit.)Britt./*Lippia citriodora* H. B. K./*Verbena triphylla* L'Herit, Verbena Limón, Hierba Luisa, entre otros.

Faltan nuevas investigaciones farmacológicas para los extractos de *Aloysia triphylla* (hierba verbena). Las investigaciones conocidas usualmente se refieren al aceite etéreo. Las hojas de los pequeños arbustos, también llamados verbenas, contienen grandes cantidades de este aceite etéreo, cuyo aroma proporciona una amplia difusión como plantas ornamentales.

El medicamento y/o los extractos son aceptados en Francia tradicionalmente por las autoridades de autorización para el tratamiento sintomático de problemas digestivos por una parte y de nerviosismo y disturbios del sueño por otra parte.

Hasta ahora *Aloysia triphylla* ha encontrado uso como té beneficiosos en la industria de los productos alimenticios. En la industria de la cosmetología los aceites etéreos de la planta se utilizan para la perfumería. El uso de extractos acuosos o etanólicos-acuosos (hidrofílicos) no es bien conocido.

Un artículo de internet "Planox L" del 15.12.2003 (www.anoxymr.de) describe una composición farmacéutica (Planox L), que contiene un extracto acuoso de *Aloysia triphylla*. Sin embargo, no se describe ningún extracto de *Aloysia triphylla*, que se extrae mediante un solvente acuoso-alcohólico y que adicionalmente es soluble en agua.

El documento US-A-4 859 468 describe en la columna 5, fila 4 y siguientes, que las hojas de *Lippia citriodora* se someten a una extracción acuosa-etanólica y filtrado y luego se liofiliza. Por lo tanto, se menciona la producción de un liofilizado a partir de *Lippia citriodora*, donde se extrae una parte de medicamento con 100 partes de agua caliente. La solución se filtra entonces y se liofiliza. Sin embargo, un extracto como el que se menciona con anterioridad no puede derivarse a partir de éste.

En el documento DE 100 47 835 se describe un extracto, que está estandarizado en feniletanoides y/o flavonoides. Este extracto refrena la angiogénesis fisiológica y patológica. El extracto se basa en componentes liposolubles como por ej. clorofila no completamente soluble en agua. Es decir, el extracto descrito en la solicitud tiene otras características físico-químicas y farmacológicas. Más allá de esto, el documento DE 100 47 835 no contiene ninguna información sobre el hecho de que el extracto es soluble en agua.

De forma sorprendente se ha establecido ahora que los extractos de *Aloysia triphylla* muestran, en particular una liofilización de los mismos, nuevos e inesperados efectos farmacológicos, que no han sido ni sugeridos ni descritos con anterioridad en los contenidos conocidos de la sustancia y en las indicaciones anteriores del medicamento.

Es, por lo tanto, el objetivo de la presente invención poner a disposición un extracto de *Aloysia triphylla* nuevo y de amplia aplicación.

Este objetivo se logra mediante el objeto de las reivindicaciones independientes. Las formas preferidas de realización se indican en las reivindicaciones dependientes.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que un extracto nuevo obtenido a partir de *Aloysia triphylla* sobre la base de solventes hidrofílicos tiene una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas que hasta ahora no se habían atribuido a la planta en su totalidad ni a fracciones de la misma.

Por lo tanto, la invención se refiere al uso de un extracto de *Aloysia triphylla*, preferentemente al extracto seco, la tintura madre, el extracto fluido, o una fracción del mismo o un liofilizado del mismo, respectivamente, o de uno o más ingredientes activos del extracto como un protector de matriz para la inhibición de angiogénesis patológicas así como en particular para el tratamiento y prevención de enfermedades tumorales, artritis reumatoide y otras enfermedades crónicas tales como por ejemplo Alzheimer, psoriasis, retinopatías y periodontitis de los dientes donde ésta, sin embargo, es sólo un listado de ejemplos y se toman en consideración futuras acciones terapéuticas también en otros campos donde la inhibición de la angiogénesis juega un papel.

La característica clave del extracto de *Aloysia triphylla* según la invención es que el extracto se obtiene a partir de materia prima vegetal con uno o más solventes hidrofílicos y que esencialmente es completamente soluble en agua.

ES 2 302 061 T3

Entre otros, el extracto muestra un excelente efecto antiinflamatorio y puede por lo tanto encontrar uso en distintos campos, por ejemplo en medicina, cosmética, etc.

5 Tal como se ha mencionado con anterioridad, el extracto puede existir en muchas formas que ya son conocidas por ejemplo como extracto seco, tintura madre, extracto fluido, extracto específico o los liofilizados de los mismos. El término “extracto” como se emplea aquí también comprende fracciones, es decir subgrupos del extracto que contienen el agente activo que se obtuvieron por ejemplo por tratamiento adicional con solventes hidrofílicos individuales.

10 La preparación de un extracto específico de *Aloysia triphylla* que tiene un alto contenido de ingredientes activos se logra por ejemplo siguiendo la extracción con solventes sobre la base de agua/alcohol seguida por la partición con solventes orgánicos tales como por ejemplo acetona, cloroformo, diclorometano, etil acetato, etc. y la subsiguiente purificación cromatografía por ejemplo sobre gel de sílice o material RP 18.

15 La preparación de un extracto específico completamente soluble en agua a partir de *Aloysia triphylla* se muestra en la figura 1. El procedimiento de preparación también se explica en los ejemplos.

20 Extractos fluidos y extractos específicos (extractos completamente solubles en agua ajustados a un contenido mínimo de oligosacáridos antioxidantes) y la preparación de los mismos son conocidos en la técnica anterior. Aquellos entendidos en la técnica en cualquier momento serán capaces de variar las condiciones de preparación para obtener composiciones útiles. Pueden encontrarse protocolos relevantes en particular en DAB 2004 o EAB 4, 7ma., suplemento. Información técnica relevante adicional está contenida en libros de texto o tecnología farmacéutica, por ejemplo en “Pharmazeutische Technologie”, Rudolf Voigt, 9na. edición completamente revisada, o en “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18va. edición.

25 Los extractos de *Aloysia* y fracciones de los mismos aquí descritas son extractos obtenidos mediante extracción acuosa-etanólica, a partir de las partes de la planta aéreas de *Aloysia triphylla* que son capaces de ser esencialmente completamente disueltas en agua. Estas preparaciones están caracterizadas por un contenido particular de oligosacáridos no volátiles, hidrofílicos antioxidantes. Esta es una diferencia sustancial en comparación con otros extractos de *Aloysia* utilizados en el mercado hasta ahora que son obtenidos mediante destilación con vapor de agua y que
30 contienen aceites esenciales volátiles, lipofílicos.

El término “oligosacáridos antioxidantes” como se utiliza aquí indica oligosacáridos que por ejemplo son di-, tri- a nonasacáridos y son sustituidos por grupos antioxidantes, por ejemplo ácido(s) caféico, 3,4-hidroxifenil etanol, luteolina, etc. en este punto debe indicarse que después de un trabajo de investigación comprensivo los inventores han encontrado
35 que estos grupos antioxidantes solos no muestran el efecto del extracto total. Es la mezcla de oligosacáridos presente en los extractos según la invención que desarrollan un efecto óptimo.

Las mezclas específicas de etanol-agua utilizadas, la temperatura de extracción, el período de extracción y la cantidad de extractante varían entre lotes de materia prima vegetal y son dependientes del contenido de oligosacáridos
40 antioxidantes y del contenido de sustancias de interferencia no deseadas (como por ejemplo clorofila, carotenoides y otros componentes, en particular, lipofílicos). Por lo tanto, el procedimiento para obtener los extractos según la invención debe adaptarse, como se ha apropiado, dependiendo del tipo de la materia prima vegetal utilizado que por supuesto no representará ningún problema para aquellos entendidos en la técnica de los fitofarmacéuticos.

45 Los dos criterios importantes a considerar en el procedimiento de preparación son los siguientes:

1. a) no deben utilizarse temperaturas de más de 90°C en el procedimiento de extracción debido a que esto conduce a la hidrólisis de los agentes activos y por lo tanto a una reducción o incluso a una completa eliminación del efecto del extracto;

50 2. b) los extractos obtenidos deben esencialmente ser solubles en agua sin ningún residuo.

Si en casos individuales surge la pregunta de si el extracto tiene los efectos (óptimos) esperados o no, el extracto de *Aloysia* puede examinarse en cuanto sus efectos mediante el ensayo HET-CAM (descrito continuación) y opcionalmente puede ser adaptado (estandarización biológica).
55

La presente invención en particular se refiere a los siguientes aspectos y realizaciones:

60 Según un primer aspecto, la invención se refiere a un extracto de *Aloysia triphylla* en el cual el extracto se tiene mediante uno o más solventes hidrofílicos y es capaz de ser esencialmente disuelto completamente en agua. En la presente invención es más preferible que el extracto sido soluble en agua sin ningún residuo lo cual, sin embargo, puede no lograrse completamente en algunos casos debido al procedimiento de extracción elegido. Debe entenderse que también aquellos extractos todavía se encuentran en el ámbito de la presente invención.

65 El solvente hidrofílico utilizado para la extracción preferentemente es agua y etanol.

Según una realización preferida el extracto es un extracto seco, un extracto fluido o un extracto específico.

La invención también se refiere a un extracto que puede prepararse según el procedimiento de preparación mostrado en la figura 1.

El extracto según la invención también puede estar en una forma liofilizada para lograr un almacenamiento y una subsiguiente reconstitución en agua (por ejemplo *Aqua ad Injectabilia*) tan eficientes como sea posible.

Según un segundo aspecto, la invención se refiere a productos alimenticios, fármacos nutricionales o cosméticos que contienen un extracto de *Aloysia triphylla* tal como se definió con anterioridad. Algunos ejemplos para la aplicación del extracto en el campo de los productos alimenticios pueden encontrarse en el ejemplo 4.

Según un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un extracto de *Aloysia triphylla* como se definió con anterioridad y uno o más adyuvantes/transportadores farmacéuticos.

Esta composición farmacéutica preferentemente está destinada para la administración mediante inyección, administración sistémica y/o tópica.

Según un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al uso de un extracto de *Aloysia triphylla* o un liofilizado del mismo o un extracto de *Aloysia triphylla* ajustado para, por ejemplo, flavonoides o propiedades antioxidantes (por ejemplo equivalentes trolox) para la preparación de medicamentos y para la profilaxis química y tratamiento de enfermedades tales como por ejemplo colitis, artritis reumatoide, enfermedades intestinales crónicas (por ejemplo Morbus Crohn).

Tal como se ha mencionado con anterioridad, los extractos según la invención son obtenidos a partir de la droga total de la planta ("Herba"), es decir de todas las partes aéreas de la planta (tallos, hojas, flores). Por lo tanto, aceites esenciales también pueden estar comprendidos en las composiciones según la invención a pesar de que los mismos no representan la porción principal de agentes activos.

Por otra parte, la presente invención se refiere al uso de un extracto de *Aloysia triphylla* o un liofilizado del mismo o un extracto de *Aloysia triphylla* ajustado por ejemplo en flavonoides o propiedades antioxidantes (por ejemplo equivalentes trolox), respectivamente, para la protección contra la degradación del cartílago en por ejemplo coyunturas.

De acuerdo con la invención, el extracto se presenta preferentemente como un extracto fluido. Como se ha mencionado con anterioridad, la dosificación del extracto fluido se encuentra entre 20 mg y 2 g por día basado en la sustancia seca.

Los extractos, etc., según la invención encuentran uso como un alimento botánico, en particular como un medicamento, un fármaco nutricional, alimento funcional, alimento original, componente cosmético (por ejemplo en temas de protección solar, cremas antiedad y pomadas, productos para después del afeitado, composiciones para el cuidado del cabello, etc.) y en productos alimenticios que tienen propiedades antioxidantes. En otras palabras, la presente invención no está dirigida al uso de lóbulos aceites esenciales ya conocidos y también ampliamente utilizados.

Por otra parte, la invención se refiere a un liofilizado preparado a partir del extracto de *Aloysia triphylla* como se definió con anterioridad así como un producto botánico, un fármaco nutricional o cosmético que contiene un extracto de *Aloysia triphylla*.

Finalmente, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de extractos según la invención.

Según la invención, las tabletas recubiertas, cápsulas de gelatina dura, preparaciones líquidas de la sustancia seca del extracto fluido son preferentemente utilizadas como formas de presentación como formas orales, de uso tópico o inyectables.

A pesar de que el uso principal pretendido es en humanos, también es posible el uso en el campo veterinario.

Los extractos de *Aloysia* tienen fuertes propiedades antioxidantes -como se muestra en la prueba DPPH. De forma sorprendente, sin embargo, éstos no tienen propiedades pro-oxidantes tales como por ejemplo la vitamina C que puede llevar a la degradación de los glicosaminoglicanos (por ejemplo heparina, condroitinsulfatos, herapansulfatos). Los extractos inhibieron la degradación de los glicosaminoglicanos causado por iones de hierro libres y peróxido de hidrógeno (ver la figura 2).

Debido a este novedoso efecto de los extractos de *Aloysia* son capaces de disminuir o detener, respectivamente la degradación de por ejemplo cartílago o la degradación de la matriz extracelular que son características esenciales en la patogénesis de un número de enfermedades crónicas. La degradación de glicosaminoglicanos que son componentes de la matriz extracelular es de gran importancia para la inducción de angiogénesis. Los agentes activos o los extractos que inhiben la degradación de la matriz extracelular (protectores de la matriz) no se han conocido hasta ahora.

Los efectos farmacológicos de los extractos descritos de *Aloysia* supuestos a partir de los experimentos *in vitro* se han probado *in vivo* mediante la inhibición de angiogénesis patológica de diferentes génesis utilizando la membrana corioalantónica (HET-CAM) de un huevo de gallina incubado (ver la figura 4). Además, es inhibida la irritación

causada por especies de oxígeno reactivo (ROS) en la membrana corioalantónica (ver la figura 5). La angiogénesis fisiológica no es inhibida por los extractos de *Aloysia* (ver la figura 3).

Una matriz extracelular intacta es esencial para un tejido sano. La degradación de los componentes causó por ejemplo de generación del cartílago o la inducción de angiogénesis patológica.

La angiogénesis es un procedimiento de diferenciación fisiológica del tejido en el desarrollo embrionario, a continuación de la menstruación femenina o en la curación de una herida. Esta diferenciación se inicia mediante los capilares en los cuales la lámina basal es localmente destruida, las células endoteliales migran y proliferan, forman un tubo así como un bucle con lados adyacentes de proliferación. La lámina basal está formada en los vasos nuevamente generados. Este procedimiento está sujeto a regulación a través de mediadores antagonistas. Entre los factores estimulantes de la angiogénesis están el factor de crecimiento del fibroblasto ácido (FGF-1), el factor de crecimiento del fibroblasto básico (FGF-2), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la interleucina 1a (IL 1a), entre otros. Los inhibidores endógenos antagonizan con estos factores estimulantes y evitan la angiogénesis en el individuo sano.

La angiogénesis juega un rol en la patogénesis en diferentes enfermedades. Esto incluye sobre todo enfermedades tumorales. Tanto el crecimiento de un tumor sólido y la metástasis son dependientes de la angiogénesis en el tejido tumoral. Muchos otros ejemplos de enfermedades en los cuales la angiogénesis juega un rol patológico.

Los inhibidores de la angiogénesis que son efectivos y que tienen bajos efectos colaterales todavía son hoy día una necesidad terapéutica debido a que todavía no hay ningún inhibidor de angiogénesis aprobado para el uso en humanos. A pesar de que diferentes inhibidores de la angiogénesis, por ejemplo suranim, ya han sido clínicamente estudiados, el beneficio terapéutico se ha puesto en duda debido a efectos tóxicos.

Con la información farmacológica del liofilizado del extracto fluido de *Aloysia triphylla* en la CAM del embrión de gallina se obtuvo sorprendentemente una fuerte inhibición de la angiogénesis patológica. No se han observado ni irritación de la membrana ni efecto tóxico del extracto. Hasta el presente no se han informado efectos colaterales en el uso de *Aloysia triphylla*.

Los inhibidores de la angiogénesis son buscados en las estrategias terapéuticas novedosas para el tratamiento de artritis reumatoide debido a que la patogénesis de proliferación sinovial está acompañada por una neovascularización. La supresión de la proliferación de células endoteliales puede ser considerada como un objetivo terapéutico importante debido a que así también puede esperarse una reducción del proceso patológico-inmunológico.

La presente invención se interpreta a través de las siguientes ilustraciones y ejemplos. Naturalmente, el ámbito de protección no está limitado más que a través de las reivindicaciones.

Los siguientes se muestran las figuras:

La figura 1 muestra un diagrama de flujo de la preparación de un extracto según la invención.

La figura 2 muestra la inhibición de la degradación de glicosaminoglicanos (por ejemplo, condroitinsulfato A) mediante especies de oxígeno reactivo (ROS) mediante el extracto soluble en agua de *Aloysia* según la invención. En contraste, la vitamina C antioxidante aumenta la degradación de glicosaminoglicanos bajo condiciones fisiológicas (valor de pH 7,2, 37°C);

La figura 3 muestra el impacto de un extracto soluble en agua de *Aloysia* según la invención sobre la angiogénesis fisiológica en comparación con la vitamina C;

La figura 4 representa la inhibición de la angiogénesis patológica causada por inflamación crónica por medio de un extracto soluble en agua de *Aloysia* según la invención en comparación con la vitamina C.

La figura 5 muestra la inhibición de la irritación en la membrana corioalantónica causado por especies reactivas de oxígeno (ROS).

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de un extracto específico soluble en agua a partir de Aloysia triphylla (ver también la figura 1)

El material vegetal seco, cortado de *Aloysia triphylla* (componentes aéreos con o sin flores, u hojas, o tallos, respectivamente, solos) conteniendo una cantidad mínima de oligosacáridos antioxidantes se extrae con agua o con mezclas de agua/etanol (por ejemplo agua/etanol = 50/50 (V:V)) a 40°C durante aproximadamente 8 horas. La relación de material vegetal seco respecto al extractante puede variar y es de 1:4 a 1:100 partes. Las mezclas de etanol-agua, temperatura de extracción, período de extracción y la cantidad de extractante específicos utilizados varía entre lotes y son dependientes del contenido de oligosacáridos antioxidantes y del contenido de sustancias de interferencia no deseadas (tales como por ejemplo clorofila, carotenoides, y otros componentes, en particular lipofílicos).

ES 2 302 061 T3

Las condiciones precisas de la extracción están en cada caso determinadas en experimentos preliminares utilizando analíticas para oligosacáridos antioxidantes que deben estar contenidos en los extractos en una cantidad mínima, como se ha mencionado con anterioridad.

- 5 A continuación de la extracción se realiza una centrifugación en una centrífuga de corriente (“centrífuga de leche”) para separar los componentes insolubles. Los componentes insolubles separados (bagazo) son descartados. El sobrenadante (sobreflujo) se congela a 4°C pero el menos a 40°C. Después de un período de almacenaje de hasta un mes los componentes lipofílicos precipitados (en particular clorofila) se extraen mediante filtración.
- 10 Después de esto, el filtrado se concentra entre 50 y 60 grados Celsius en vacío hasta aproximadamente entre una décima parte y un cuarto del volumen original. La solución concentrada se refrigera nuevamente hasta 4°C y al menos a 40°C. A continuación de esta clarificación final la materia precipitada o floculada suspendida se extrae después de un periodo de almacenamiento de hasta un mes por medio de filtración.
- 15 A continuación, se añade al filtrado un material inerte, por ejemplo maltodextrina o aerosil, para obtener una concentración deseada de oligosacáridos antioxidantes en el producto final. La etapa final de secado se realiza en un concentrador de vacío o en una cinta transportadora de secado a temperaturas entre 40 y 90°C. A continuación, el material seco se muele en un molino hasta el tamaño de grano deseado. El polvo se envasa en vacío. El producto final que es adecuado para la preparación de bebidas se disuelve en agua sin restos (especialmente, no se segregan partículas coloreadas (“puntos” negros). El producto final contiene una cantidad mínima de oligosacáridos antioxidantes de aproximadamente 10% y satisfacen los criterios mínimos de pureza microbiológica según las regulaciones alimentarias y de farmacopea. También permanece por debajo y por lo tanto guarda los límites superiores de metales pesados, herbicidas, y pesticidas regulado por la ley.
- 20

25 Ejemplo 2

Eficacia anti inflamatoria del extracto de Aloysia triphylla en la prueba HET-CAM

- Con este propósito, 10 µl de una solución de 50 mg del liofilizado (de la composición obtenida en el ejemplo 1 anterior) en 1 ml de solución de agarosa (conteniendo 5 mg de lauril sulfato/ml) se aplicaron a la CAM como gránulo de prueba. La angiogénesis causada por la inflamación apareció menor o más aún fue completamente suprimida en el aria del gránulo de prueba en comparación con el experimento de control. Esta presentación experimental es un modelo admitido para el examen in vivo de la inhibición de la angiogénesis y prueba los novedosos efectos farmacológicos inesperados de los liofilizados antes mencionados. A este respecto, ver también la figura 4.
- 30

- 35 La prueba de HET-CAM es una de un número de modelos de pruebas para examinar sustancias respecto a su inhibición de angiogénesis patogénica para posibles aplicaciones terapéuticas. La ventaja de la prueba HET-CAM es que pertenece a aquellos experimentos in vivo que permite una predicción más definitiva en lo que concierne a la importancia clínica que en los procedimientos in vitro. Esta prueba in vivo contiene el sistema complejo de angiogénesis con todas sus funciones celulares y mediadores que permiten una predicción relativamente segura respecto a la acción inhibidora sobre la angiogénesis. Esta prueba es considerada como un procedimiento de control para la detección de sustancias que tienen propiedades inhibidoras de la angiogénesis (Svahn, C. M., M. Weber, C. Mattsson, K. Neiger, M. Palm Carbohydr. Polym. 18, 9-16 (1992); Hahnenberger R., A. M. Jakobsen, A. Ansari, T. Wehler, C. M. Svahn, U. Lindahl, Glycobiology 3, 567-573 (1993); y Galliardi, A., H. Hadd, D. C. Collins, Cancer Research 52, 5073-5075 (1992)).
- 40
- 45

Ejemplo 3

Confirmación de los resultados obtenidos en la prueba de HET-CAM en un experimento animal

- 50 Los resultados del ensayo HET-CAM pueden ser además confirmados en un modelo animal de inflamación crónica. El efecto del extracto se examinó en un modelo de ratón de colitis aguda inducida por dextrano sulfato.

- 55 Con este propósito, se indujo una colitis aguda en un total de 10 ratones por medio de dextrano sulfato. Debido a su inflamación intestinal los ratones perdieron peso. Los parámetros terminales son la determinación del peso de los ratones, la longitud intestinal y la reducción de las interleucinas conocidas que causan inflamación.

- 60 A continuación de la administración de 600 µg de extracto de Aloysia soluble en agua diariamente (durante 10 días) el peso final de 5 ratones después de 10 días de tratamiento se incrementó significativamente (p=0,05) en comparación con el grupo de control (5 ratones). Los resultados del tratamiento se presentan en la tabla 1. Los valores listados son valores medios con los máximos rangos de variación.

ES 2 302 061 T3

TABLA 1

Tratamiento	Peso inicial en gramos	Peso final en gramos
	(Día 0)	(Día 10)
600 µg de extracto según la invención (ver con anterioridad)	21,2 (+/- 0,8)	19,2 (+/- 1,2)
PBS (control)	20,8 (+/- 0,5)	15,4 (+/- 1,4)

Los valores de IFN y IL-10 fueron significativamente reducidos después de la estimulación en células MLN obtenidas a partir de ganglios linfáticos.

Estos resultados del experimento de ratones confirma el uso exitoso de la composición según la invención en la inflamación crónica, en particular del tracto intestinal.

Ejemplo 4

Preparación de productos alimenticios que contienen el extracto según la invención

Producto inicial: fracción soluble en agua de un extracto alcohólico de *Aloysia triphylla* (obtenido como en el ejemplo 1 anterior), optimizado aun contenido en oligosacáridos antioxidantes de aproximadamente 10%.

La tabla 2 muestra las relaciones de mezclado del extracto en cada uno de los productos lácteos. Se obtuvieron los resultados enumerados en la tabla.

TABLA 2

	Yogurt (fresa) ELS 04-06/2003	Queso fresco (Sabor hierbas) ELS 04-06/2003	Batido de leche (mezcla básica) ELS 10/2003
Dosificación	a) 1000 mg/ 150g b) 500 mg/ 150g c) 250 mg/ 150 g	a) 3000 mg/ 200 gr b) 1000 mg/ 200g c) 500 mg/ 200 g	a) 750 mg/ 11 b) 500 mg/ 11 c) 250 mg/ 11
Sabor	d) amargo e) levemente amargo f) levemente amargo	d) sin e) sin f) sin	d) sin e) sin f) sin
Color	g) levemente marrón	g) levemente marrón	g) marrón h) levemente

ES 2 302 061 T3

	h) neutro i) neutro	h) neutro i) neutro	marrón i) neutral
Olor	sin	sin	Sin
Miscibilidad	Totalmente miscible	Totalmente miscible	Totalmente miscible
Solubilidad	Totalmente soluble	Totalmente soluble	Totalmente soluble
Estabilidad	90 días en solución acuosa ácida (pH 4)	90 días	90 días
Conservación en el producto	Al menos 28 días	Al menos 28 días	Al menos 28 días
Microbiología	OK	OK	OK
Aumento de escala	1000 kg de cada uno: de yogurt de ciruela-muesli y de manzana-muesli	1000 kg de queso fresco saborizado a las hierbas	3000 l de batido de chocolate y leche
Uso recomendado	En yogures aromatizados o con muesli; en la preparación de la fruta	En quesos frescos aromatizados o a las hierbas; en la preparación de la fruta	En sabores como chocolate, moca, nuez, etc.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tomado el máximo cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP se descarga de cualquier responsabilidad en este aspecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US4859468A [0007]
- DE10047835 [0008] [0008]

Literatura que no es de patentes citada en la descripción

- **SVAHN, C.M.M. WEBERC. MATTSSONK. NEIGER M.** *Palm carbohydr. Polym.*, 1992, vol. 18, 9-16 [0061]
- **HAHNENBERGER R.A.M. JAKOBSENA. ANSARIT. WEHLERC.M. SVAHNU.LINDAHL** *Glycobioo-*
logy, 1993, vol. 3, 567-573 [0061]
- **GALLIARDI, A.H. HADDD.C. COLLINS** *Cancer Res.*, 1992, vol. 52, 5073-5075 [0061]

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación del extracto de *Aloysia triphylla* que comprende las siguientes etapas:+

a) proporcionar la hierba seca de *Aloysia triphylla*;

b) extraer la hierba con un extractante acuoso-etanólico;

c) centrifugar y separar el residuo insoluble del extracto;

d) filtrado del extracto para separar los componentes lipofílicos, en particular clorofila;

e) concentrar, clarificar y secar dicho extracto.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el componente separado en la etapa d) es clorofila.

3. Extracto que es obtenible mediante el procedimiento según la reivindicación 1.

4. Extracto según la reivindicación 3, en donde el extracto es esencialmente completamente soluble en agua.

5. Extracto según la reivindicación 3 ó 4, en el que el extractante empleado para la extracción contiene agua y/o etanol.

6. Extracto según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el extracto es un extracto fluido o un extracto específico.

7. Extracto según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el extracto contiene oligosacáridos antioxidativos.

8. Extracto según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que está presente en una forma liofilizada.

9. Producto alimenticio, nutricional o cosmético que contiene un extracto de *Aloysia triphylla* según una o más de las reivindicaciones 3 a 8.

10. Composición farmacéutica que contiene un extracto de *Aloysia triphylla* según una o más de las reivindicaciones 3 a 8 y uno o más adyuvantes/transportadores farmacéuticos.

11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, está diseñada para su administración mediante inyección, administración sistémica y/o tópica.

12. Uso de un extracto según una o más de las reivindicaciones 3 a 8 para la preparación de un medicamento para la profilaxis química y el tratamiento enfermedades crónicas, y colitis.

13. Uso según la reivindicación 12, en el que las enfermedades crónicas son artritis reumatoide, y enfermedades intestinales crónicas.

14. Uso de un extracto según una o más de las reivindicaciones 3 a 8 para la preparación de un medicamento para la protección contra la degradación de cartílago.

15. Uso según una o más de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la dosificación del extracto fluido está comprendida entre 20 mg y 2 g por día basado en sustancia seca.

DIAGRAMA DE FLUJO

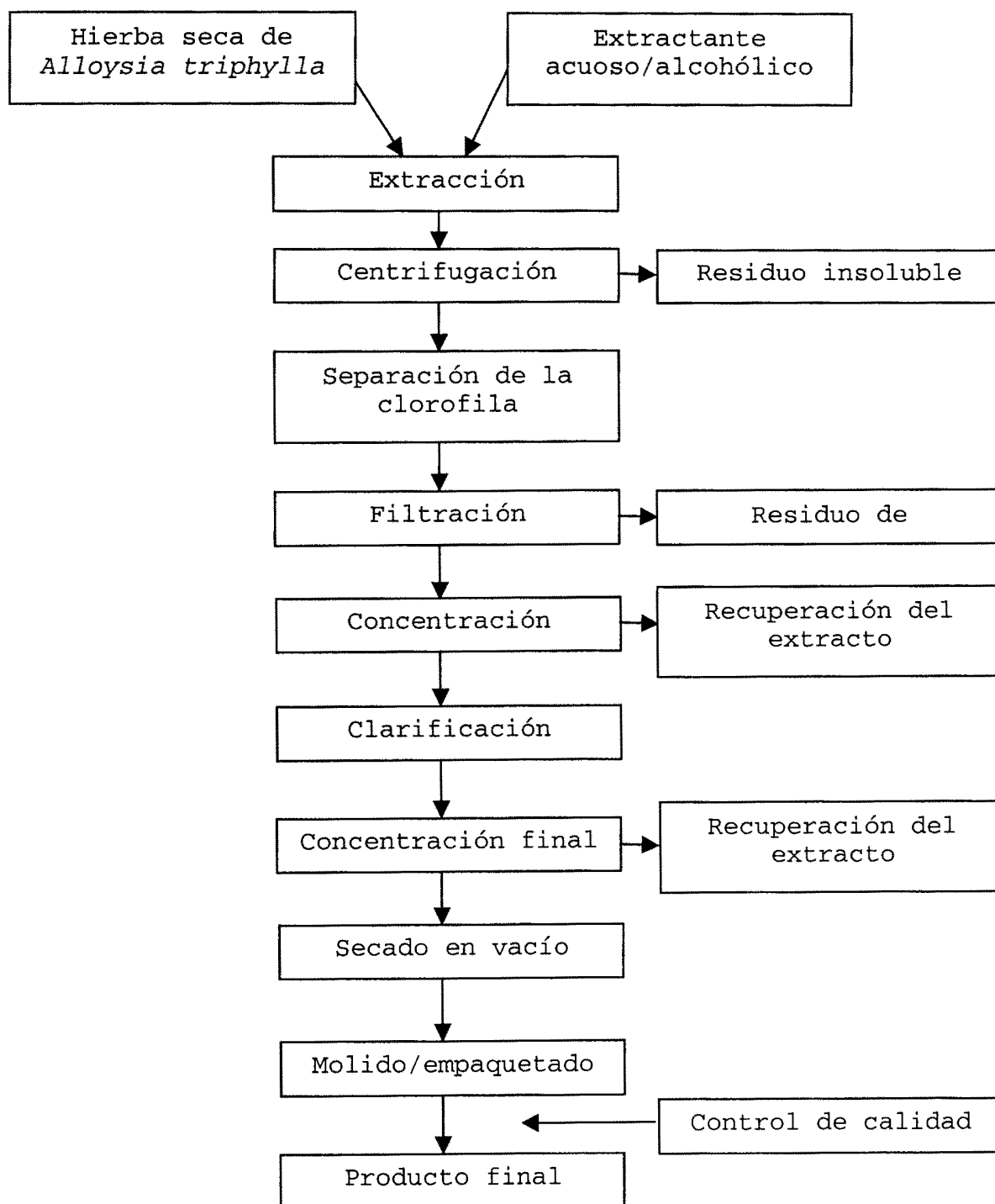
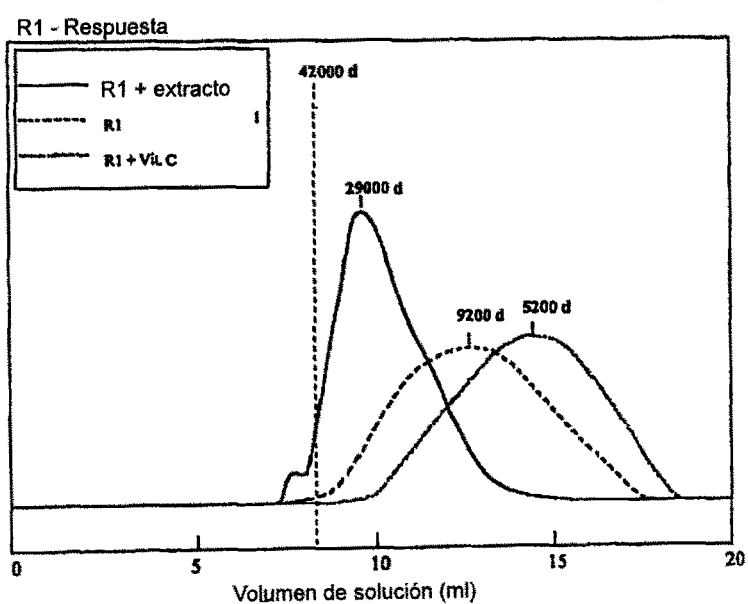


FIGURA 1

Influencia del extracto y de la vitamina C en la degradación de condroitinsulfato A inducida por radicales



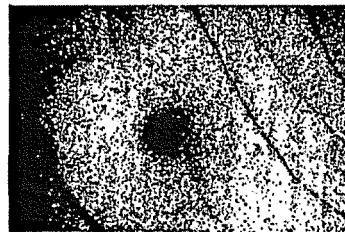
42000 d = Peso molecular del condroitinsulfato A
 Fase estacionaria: Superdex 75
 Fase móvil: Solución 0,1 NaCl

FIG. 2

Comparación del extracto y la vitamina C en el ensayo CAM



Puntuación 0:
Sin efecto angiogénico



Puntuación 2:
Efecto angiogénico más
fuerte (área libre de capilaridad
alrededor del gránulo)

- sin efecto angiogénico
- sin irritación de la membrana
- efecto tóxico

FIG. 3

Comparación del extracto con la Vitamina C en el ensayo HET-CAM

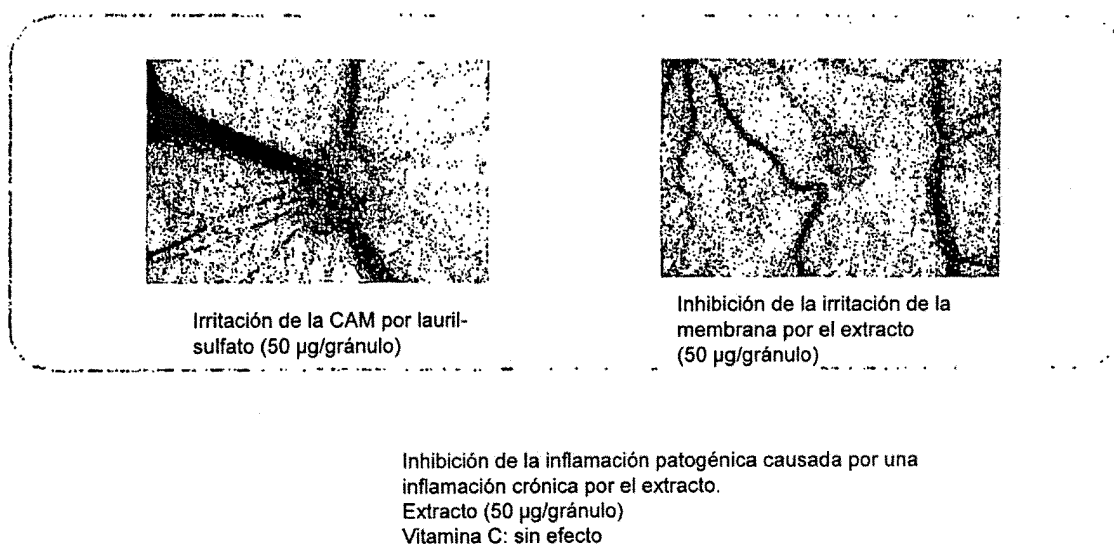


FIG. 4

FIG. 5 Comparación del extracto con la vitamina C
en el ensayo de anillo HET-CAM



Irritación de la CAM causada
por el reactivo Fenton combinado
con vitamina C
(50 µg/gránulo)



Extracto (50 µg/gránulo)
Irritación de la CAM en
combinación con el
reactivo Fenton

Inhibición de la irritación causada por
especies reactivas de oxígeno
mediante el extracto
(50 µg/gránulo)
Vitamina C: sin efecto