

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 912**

51 Int. Cl.:
A61K 36/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08750733 .1**
96 Fecha de presentación: **02.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2150263**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.02.2010**

54 Título: **Extracto vegetal y su uso terapéutico**

30 Prioridad:
01.06.2007 GB 0710536

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2012

73 Titular/es:
**INSIGNION HOLDINGS LIMITED
CANON'S COURT, 22 VICTORIA STREET
HAMILTON HM12, BM**

72 Inventor/es:
KREUTER, Matthias, Heinrich

74 Agente/Representante:
Mato Adrover, Ángel Luís

ES 2 378 912 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 vegetal y su uso terapéutico.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a un extracto vegetal, es decir una composición que comprende un extracto acuoso de flores de manzanilla para el tratamiento de un estado proliferativo y/o inflamatorio y al uso de dicha composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un estado proliferativo y/o inflamatorio.

10 La invención se refiere particularmente a una composición que comprende un extracto acuoso de flores de manzanilla para el tratamiento de un estado proliferativo y/o inflamatorio, en la que las flores de manzanilla son flores tubiformes. La invención se refiere además al uso de dicha composición, caracterizado porque el estado es cáncer, preferiblemente un glioblastoma o cáncer de pulmón o cáncer de próstata. La invención también se refiere al uso de dicha composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un estado inflamatorio, más preferiblemente enfermedad de Chron, lo más preferiblemente esclerosis múltiple.

Antecedentes de la invención

15 Se conocen desde hace milenios las propiedades terapéuticas de diversas plantas. Sin embargo, incluso en la actualidad, se entienden poco la naturaleza del componente o componentes eficaces y sus propiedades, incluso para aquellas plantas que se han estudiado, puesto que el desarrollo farmacéutico se centra generalmente en pequeñas moléculas que se considera que tienen propiedades relativamente predecibles y cuya síntesis puede controlarse.

20 Uteshev *et al*, Eksp. Klin. Farmakol. (Nov.-Dic. de 1999) 62(6):52-5, describen la actividad de inmunomodulación de heteropolisacáridos obtenidos de la manzanilla alemana (*Matricaria chamomilla*) durante el enfriamiento mediante inmersión y al aire. Laskova y Uteshev, Antibiot. Khimioter. (1992 Jun) 37(6):15-8, describen la acción de inmunomodulación de heteropolisacáridos aislados de flores de manzanilla. Se administró el extracto de base acuosa por vía oral o mediante inyección intraperitoneal. Los autores no sugieren ninguna utilidad terapéutica, sino que más bien notifican que el efecto estimulante depende del régimen de dosificación y, principalmente, de la manera y el grado de enfriamiento de las ratas sometidas a prueba.

25 El documento WO2005/070440 se refiere al uso de una fórmula herbal para el tratamiento del asma alérgica o el asma bronquial crónica, comprende cantidades específicas flores de manzanilla secadas y molidas, frutos de anís, semillas negras, etc. administrados como infusión de té.

30 El documento WO03/101479 describe las propiedades terapéuticas valiosas de una composición que comprende varios componentes, normalmente administrados juntos mediante inyección intramuscular. La composición que se usó comprendía un extracto de manzanilla, aunque no se le atribuyó ninguna actividad terapéutica al mismo; más bien, se describe como un anti-irritante cuya presencia puede aliviar el efecto desagradable de la inyección en sí misma.

El documento WO2007/057651 da a conocer un procedimiento para la eliminación de endotoxinas de la manzanilla.

35 El documento WO 03/033007 describe la preparación de extractos etanólicos acuosos de flores de manzanilla poniendo en contacto flores de manzanilla con dicho disolvente, empapándolas y separando la fase líquida tras un determinado periodo de tiempo. En la siguiente etapa, se evapora el extracto líquido obtenido para eliminar los disolventes de extracción, y se obtiene una mezcla de materias extractivas. Debido a la evaporación, que es una destilación con vapor a una presión reducida, el extracto obtenido está libre o esencialmente libre de aceites esenciales. Los aceites esenciales son volátiles y desaparecen por tanto.

40 El documento WO 2007/057651 enseña la preparación de infusiones acuosas de manzanilla de cabezuelas florales de manzanilla poniendo en contacto el material vegetal con agua, calentando, enfriando, sometiendo a filtración en capa profunda y filtración estéril (a través de una membrana de 0,22 um). Durante este procedimiento, se eliminan las trazas de aceites volátiles obtenidos mediante dicho procedimiento de extracción ya que el aceite volátil es insoluble en agua a la temperatura usada (de 30°C a 40°C) y forma pequeñas gotas lipídicas que no pasan por los tamaños de poro usados en el procedimiento de preparación así como el procedimiento de purificación posterior (eliminación de endotoxinas).

45 El documento US 6 300 370 B1 da a conocer un procedimiento para la producción de aceite de manzanilla que tiene un alto contenido en espiroéteres cis y trans, caracterizado por una destilación con vapor o una destilación acuosa de manzanilla fresca o un residuo de extracción de manzanilla. Dichos espiroéteres tienen propiedades antiinflamatorias y espasmolíticas.

50 Hajhashemi V. *et al.*, "Black Cumin Seed Essential Oil, as a Potent Analgesic and Anti-inflammatory Drug", Phytotherapy Research, 18, (2004) 195-199, describen propiedades analgésicas y antiinflamatorias del aceite esencial destilado con vapor de semilla de neguilla.

El Mohamed *et al.*, "Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1760, n.º 7, (2006) 1088-1095, describen el efecto antiinflamatorio de timoquinona, el principio activo en el aceite volátil de semillas de *Nigella sativa*, una biosíntesis de leucotrienos en un modelo de ratón de asma alérgica.

5 Sumario de la invención

Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que un extracto de manzanilla, obtenido de las cabezuelas florales, preferiblemente obtenido mediante destilación con vapor, tiene propiedades terapéuticas valiosas. Se sabe que tales extractos acuosos consisten en los componentes volátiles de las cabezuelas florales de manzanilla y se describen en la Farmacopea Europea (*Matricariae Aetheroleum* Farm. Eur. 5, corregida .5.1).

10 En particular, se ha descubierto que dichos extractos pueden reducir la síntesis de ADN en células cancerosas humanas e inhibir la producción de leucotrienos e IL-6 (interleucina 6). Más sorprendentemente, se ha descubierto que la inhibición de la síntesis de leucotrienos del aceite volátil se potencia sinérgicamente en presencia del aceite de semillas de neguilla (*Nigella sativa*).

15 Especialmente, se encontró que eran sensibles las células cancerosas que se sabe que producen interleucina 6 como factor de crecimiento por sí mismas y las células cancerosas que se sabe que producen leucotrienos por sí mismas. Puede deducirse que el aceite volátil de manzanilla solo y una combinación con aceite de semillas de neguilla tienen propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas inesperadas a fecha de hoy, por ejemplo en el tratamiento de la inflamación, inmunopatía y cáncer.

Por consiguiente, la invención se refiere a

20 (1) una composición que comprende un extracto acuoso de flores de manzanilla, siendo este extracto acuoso un aceite volátil que puede obtenerse mediante un procedimiento de extracción que comprende una destilación con vapor de agua de flores de manzanilla, y

- aceite de neguilla

para el tratamiento de un estado proliferativo y/o inflamatorio;

25 (2) la composición según (1), en la que la destilación con vapor de agua de flores de manzanilla se lleva a cabo a presión reducida;

(3) la composición según (1) o (2), en la que las flores de manzanilla son flores tubiformes;

(4) la composición según (2) o (3), en la que la destilación con vapor se realiza bajo atmósfera de nitrógeno y el procedimiento comprende además las etapas de

30 (i) poner en contacto la composición con una povidona reticulada que forma un complejo con cumarinas;

(ii) eliminar el complejo de povidona reticulada y cumarina formado en la etapa (i);

(iii) eliminar los residuos de agua poniendo en contacto la composición obtenida de la etapa (ii) con sulfato de sodio anhidro; y

(iv) separar el sulfato de sodio de la composición obtenida en la etapa (iii);

35 (5) la composición según (4), en la que aceite de neguilla es un aceite de neguilla purificado que puede obtenerse mediante un procedimiento de purificación que comprende las etapas de

(i) poner en contacto aceite de neguilla con una povidona reticulada que forma un complejo con compuestos fenólicos;

(ii) eliminar el complejo de povidona y compuestos fenólicos formado en la etapa (i);

40 (iii) eliminar los residuos de agua poniendo en contacto el aceite de neguilla obtenido de la etapa (ii) con sulfato de sodio anhidro; y

(iv) separar el sulfato de sodio del aceite de neguilla obtenido en la etapa (iii);

(6) la composición según cualquiera de (1) a (5), caracterizada porque el estado es un estado inflamatorio, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Chron y esclerosis múltiple;

45 (7) la composición según cualquiera de (1) a (5) caracterizada porque el estado es cáncer, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en glioblastoma, cáncer de pulmón y cáncer de próstata;

(8) la composición según cualquiera de (1) a (6), caracterizada porque el estado inflamatorio está causado por

autoinmunopatía, preferiblemente desencadenado por interleucina 6, más preferiblemente desencadenado por leucotrienos, lo más preferiblemente dependiente de la presencia de interleucina 6 y/o leucotrienos;

5 (9) la composición según cualquiera de (1) a (5) y (7) caracterizada porque el estado está causado por un trastorno proliferativo, preferiblemente desencadenado por interleucina 6, más preferiblemente desencadenado por leucotrienos, lo más preferiblemente dependiente de la presencia de interleucina 6 y/o leucotrienos;

(10) uso de la composición según cualquiera de (1) a (5) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un estado proliferativo y/o inflamatorio; y

(11) el uso según (10), en el que el estado es según cualquiera de (6) a (9).

Descripción de la invención

10 La invención se basa en datos obtenidos usando un extracto acuoso de cabezuelas florales de manzanilla, que puede obtenerse mediante destilación con vapor. De manera precisa, el extracto acuoso se compone de los componentes volátiles de las cabezuelas florales de *Matricaria recutita* L., también conocida para los expertos en la técnica como *Matricariae Aetheroleum*, descrito en Farm. Eur. 5.1. La invención se basa además en datos de la planta asterácea *Matricaria recutita* L. o uno o más materiales en la misma, incluyendo aceites volátiles, camazuleno, bisabolol y otras sustancias. Un procedimiento preferido es purificar el aceite volátil obtenido
15 inicialmente poniéndolo en contacto con crospovidona (povidona reticulada) y sulfato de sodio. Los expertos en la técnica saben que la crospovidona compleja compuestos fenólicos y cumarinas. Se sabe que el sulfato de sodio se une a residuos de agua. La separación de los agentes de purificación da como resultado un extracto libre o casi libre de residuos de agua, cumarina y fenol. La fuente del extracto de manzanilla es importante. Debe ser la cabezuela floral, preferiblemente las flores tubulares de *Matricaria recutita* L. (flores tubiformes). La composición puede contener además del aceite volátil de manzanilla, el aceite de semillas de neguilla y acetilcisteína y palmitato de ascorbilo como principios activos. No es necesario que esté presente ningún otro agente.

20 La composición que se usa debe ser adecuada para inyección. Para este fin es deseable eliminar las endotoxinas, polifenoles, cumarinas y (mediante cualquier medio adecuado, conocido por los expertos en la técnica) componente de gran peso molecular, por ejemplo los que tienen un PM de más de 1.000 ó 10.000.

25 Pueden formularse composiciones para su uso en la invención mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Deben usarse componentes farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas propiedades y/o sustancias que son aceptables para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico que los fabrica desde un punto de vista físico/químico referente a factores tales como formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad.

30 La administración es preferiblemente mediante inyección intravenosa o, más preferiblemente, intramuscular, aún lo más preferiblemente mediante un inhalador como un aerosol o micro/nanoemulsión a través de las vías respiratorias.

35 La composición farmacéutica que contiene el principio activo puede estar en una forma adecuada para el uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos o polvos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables. Los comprimidos contienen el principio activo en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos tales como, por ejemplo, diluyentes inertes tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregación, por ejemplo almidón de maíz o ácido alginico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar recubiertos o recubrirse mediante técnicas conocidas para retardar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionan de ese modo una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También pueden recubrirse, para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para la liberación controlada.

45 También pueden presentarse formulaciones para uso oral como cápsulas de gelatina dura en las que se mezcla el principio activo con un diluyente sólido inerte, por ejemplo carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que se mezcla el principio activo con agua o un medio de aceite, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

50 Las suspensiones acuosas pueden contener los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes, por ejemplo un fosfátido que se produce de manera natural tal como lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileño con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o

- 5 productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol, tales como un polioxietileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polioxietileno-sorbitano. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.
- 10 Pueden formularse suspensiones oleosas suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de maní, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes (tales como los expuestos anteriormente) y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral agradable. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.
- 15 Los gránulos y los polvos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Se pusieron ejemplos de agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados anteriormente. También pueden estar presentes agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.
- 20 Una composición farmacéutica para su uso en la invención también puede estar en forma de una emulsión de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva o aceite de maní, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de éstos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas que se producen de manera natural, por ejemplo goma arábiga o goma tragacanto, fosfátidos que se producen de manera natural, por ejemplo soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitano y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietileno-sorbitano. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.
- 25 Pueden formularse jarabes y elixires con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante y agentes aromatizantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión oleaginosa o acuosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados, de los que se han mencionado ejemplos anteriormente. Una preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral no tóxico, por ejemplo como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, disolución de Ringer y disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos, estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, pueden encontrar uso los ácidos grasos tales como el ácido oleico en la preparación de inyectables.
- 30 35
- La composición también puede administrarse en forma de supositorios para la administración rectal del fármaco. Tales composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas habituales pero líquido a la temperatura rectal y por tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales son manteca de cacao y polietilenglicoles.
- 40 Para uso tópico, composiciones adecuadas son en forma de, por ejemplo, cremas, pomadas, gelatinas, disoluciones o suspensiones.
- Tal como se indicó anteriormente, la composición de la invención puede administrarse mediante inyección. Se prefiere la inyección intramuscular, aunque es adecuada cualquier administración parenteral.
- 45 También puede preferirse que la composición se administre por vía oral. En este caso, y en el caso de que se use un agente de aumento de la permeabilidad, no debe incluirse insulina en una formulación oral. Puede preferirse particularmente la administración oral para medicina veterinaria.
- 50 Pueden administrarse otros materiales activos al sujeto. Aunque no se crea que sean necesarios materiales adicionales, se ha descubierto que determinados esteroides y vitaminas, normalmente administrados por vía oral, pueden respaldar o potenciar el efecto del medicamento. Hormonas esteroideas adecuadas pueden aumentar la síntesis de proteínas específicas, desenmascarando determinados cistrones, con la ayuda de metabolitos esenciales tales como vitaminas y aminoácidos. Ejemplos de esteroides adecuados son estradiol, nandrolona y estriol. También pueden administrarse vitaminas tales como A, D y/o E. La función de la vitamina A puede ser conservar la integridad del tejido epitelial, desempeñar un papel en la síntesis de proteínas y estabilizar las membranas celulares y también las membranas subcelulares.
- 55 Aunque se ha facilitado alguna indicación en cuanto a dosificaciones adecuadas de determinados materiales, la dosificación exacta y frecuencia de administración dependen de varios factores. Estos factores incluyen los componentes particulares que se usan, el estado particular que esté tratándose, la gravedad del estado, la edad, el peso y el estado físico general del paciente particular, y otra medicación que esté tomando el individuo, tal como

conocen bien los expertos en la técnica.

Descripción de los dibujos

La figura 1A muestra los resultados de la replicación 1 de la inhibición de IL-6 en el ejemplo 1 para aceite esencial de *Matricaria*:

5 VIP_Matr_07_78

CI₅₀ = 5 µg/ml (determinado gráficamente)

CI₅₀ mediante PRISM = 7,782 µg/ml (calculado mediante GraphPad Prism)

Intervalo del 95% de 3,169 a 19,11

10 La figura 1B muestra los resultados de la replicación 2 de la inhibición de IL-6 en el ejemplo 1 para aceite esencial de *Matricaria*:

VIP_Matr07_78

CI₅₀ = 8 µg/ml (determinado gráficamente)

CI₅₀ mediante PRISM = 8,78 µg/ml (calculado mediante GraphPad Prism)

Intervalo del 95% de 6,248 a 12,35 µg/ml

15 La figura 1C muestra los resultados de la replicación 1 de la inhibición de IL-6 en el ejemplo 1 para aceite esencial de *Nigella*:

VIP_Nig'07_8

CI₅₀ = no aplicable

CI₅₀ mediante PRISM = no converge (GraphPad Prism)

20 Intervalo del 95%

La figura 1D muestra los resultados de la replicación 2 de la inhibición de IL-6 en el ejemplo 1 para aceite esencial de *Nigella*:

VIP_Nig'07_8

CI₅₀= no aplicable

25 CI₅₀ mediante PRISM = no converge (GraphPad Prism)

Intervalo del 95%

La figura 2 muestra los resultados obtenidos del ensayo de inhibición de 5-LOX en el ejemplo 2 que somete a prueba la inhibición de la actividad de 5-LOX por NICHA (promedio de 2 a 4 ensayos independientes (resultados de 3 ensayos de 5-LOX independientes para VIP_E_Nig'07_8, 4 ensayos de 5-LOX independientes para VIP_Matr 07_78 y 2 ensayos de 5-LOX independientes para la mezcla 1:1).

30

La figura 2A: VIP_Matr'07_78 (aceite de manzanilla), replicación 1

La figura 2B: VIP_Nig'07_8 (aceite de *Nigella sativa*), replicación 1

La figura 2C: VIP_Matr'07_78 (aceite de manzanilla), replicación 2

La figura 2D: VIP_Nig'07_8 (aceite de *Nigella sativa*), replicación 2

35 La figura 2E: Mezcla 1:1(V)P_Matr 07_78 : VIP_E_Nig'07_8)

La figura 3 muestra los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad en células HL-60 con WST-1 bajo la influencia de NICHA en el ejemplo 2.

La figura 3A: VIP_Matr'07_78 (aceite de manzanilla)

La figura 3B: VIP_Nig'07_8 (aceite de *Nigella sativa*)

40 La figura 4 muestra los resultados obtenidos para el efecto de NICHA sobre la síntesis de ADN en células de cáncer

de próstata DU145 en el ejemplo 3.

La figura 4A: incubación durante 24 horas, VIP_Matr'07_78 (aceite de manzanilla)

La figura 4B: incubación durante 24 horas, VIP_Nig'07_8 (aceite de *Nigella sativa*)

La figura 4C: incubación durante 48 horas, VIP_Matr'07_78 (aceite de manzanilla)

5 La figura 4D: incubación durante 48 horas, VIP_Nig'07_8 (aceite de *Nigella sativa*)

La figura 5 muestra los resultados obtenidos para el efecto de NICHA sobre la síntesis de ADN en células U-87MG en incubación durante 48 horas en el ejemplo 3.

La figura 5A: VIP_Matr'07_78 (aceite de manzanilla)

La figura 5B: VIP_Nig'07_8 (aceite de *Nigella sativa*)

10 La figura 5C: Mezcla 1:1 (VIP_Matr 07_78 : VIP_E_Nig'07_8)

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplo 1 - Actividad inhibidora en THP1 (macrófagos) sobre la liberación de interleucina 6

Muestras y sustancias de referencia

15

Muestras de prueba	Descripción	Proveedor	Art. n.º	Lote n.º	Número ViP
Aceite de <i>Nigella</i>	<i>Nigellae oleum</i>	Hänseler AG	26-4150-1	2006.08.0537	ViP_Nig'07_8
Aceite esencial de <i>Matricaria</i>	<i>Matricariae Aetheroleum</i> Farm.Eur.	Hänseler AG	1-4925-2	2006.09.0181	ViP_Matr'07_78

Sustancias de referencia	Pedido n.º	Lote n.º	Proveedor	Ensayo
NDGA	74540	422 780/1 5400	Fluka	Inhibición de 5-LOX en células HL-60 dif.

Ensayo de inhibición de IL-6

Ensayo	Línea celular	Muestra	Concentración de muestra en ensayo (basado en el peso de aceite)	Disolvente	Replicación
Inhibición de IL-6 *	THP 1 diferenciadas	ViP_Nig'07_8	300 ng, 3 µg, 30 µg/ml	EtOH abs.	2
		ViP_Matr'07_78	300 ng, 3 µg, 30 µg/ml	s.o.	2
* Se realizó el ensayo en dos replicaciones independientes					

20

Ensayo de inhibición de IL-6 en células THP-1

Se preincubaron las muestras durante 30 minutos a 37°C con células (THP-1 humanas) diferenciadas previamente con PMA (0,125 x 10⁶ células/pocillo). Se inició la reacción con LPS (1 µg/ml) y se realizó la incubación a lo largo de 24 horas a 37°C. Se llevaron a cabo controles negativos t(0) con la mezcla de ensayo sin estimulación con LPS [ref.1].

25

Se realizó la cuantificación de IL-6 con un kit de inmunoensayo enzimático (EIA) de Cayman n.º: 583361. Se midieron las densidades ópticas a una longitud de onda=415 nm. Se calcularon las cantidades usando una curva patrón de al menos 5 concentraciones diferentes.

- 5 Se midieron los puntos de cada muestra como duplicados. Se expresaron los valores de inhibición relacionada con la dosis como un porcentaje de los valores de controles positivos. Se determinaron los valores de CI_{50} (correspondientes a la concentración de muestra a la que el nivel de inhibición es del 50%) con el programa GraphPad-Prism (versión 4, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

Resultados

Los resultados para el ejemplo 1 se muestran en la figura 1

- 10 Ejemplo 2 - Actividad inhibidora de NICHA 001 en líneas celulares de cáncer humanas sobre la liberación de leucotrienos

Se investigaron las respuestas de dos líneas celulares humanas (granulocitos) en concentraciones diferentes de NICHA sobre la liberación de leucotrienos. Se realizó cada experimento con aceite de *Nigella*, con aceite de manzanilla y con una combinación de ambos aceites.

- 15 Muestras

Muestras de prueba	Descripción	Proveedor	Art. n.º	Lote n.º	Número ViP
Aceite de <i>Nigella</i>	<i>Nigellae oleum</i>	Hänseler AG	26-4150-1	2006.08.0537	ViP_Nig'07_8
Aceite esencial de <i>Matricaria</i>	<i>Matricariae Aetheroleum</i> Farm.Eur.	Hänseler AG	1-4925-2	2006.09.0181	ViP_Matr'07_78

Ensayos

Ensayos	Líneas celulares	Muestras	Concentraciones de prueba
Inhibición de 5-LOX	Granulocitos	ViP_Nig'07_8	0,3 / 3 / 30 µg/ml
	HL60 diferenciadas	ViP_Matr'07_78	0,1/0,3/1/3/10/30 µg/ml
		Mezcla	0,3 / 3 / 30 µg/ml
Ensayo de WST-1	HL-60 células	ViP_Nig'07_8 ViP_Matr'07_78	0,3 / 3 / 30 µg/ml

- 20

Ensayo de inhibición de 5-LOX

- 25 Se mantuvieron células HL-60 humanas (leucemia mieloide, DSMZ n.º ACC 3) a 37°C en una atmósfera humificada con 5% de CO₂ y se cultivaron en medio RPMI1640 completo complementado con el 10% de suero de ternera fetal y el 1% (v/v) de disolución de penicilina/estreptomicina. Se diferenciaron las células durante de 6 a 8 días con DMSO (al 1,2% v/v). Se llevó a cabo el ensayo de actividad de 5-LOX según se describe por Bennet *et al.* [ref: 2]. Brevemente, se cultivaron las células diferenciadas, se suspendieron en PBS que contenía Ca²⁺ (1 mM) y glucosa (1 mM) y se distribuyeron en una placa de microtitulación de 96 pocillos (1 x 10⁶ células/pocillo).

- 30 Tras la preincubación con muestra o vehículo durante 15 min. a temperatura ambiente se inició la reacción añadiendo ionóforo de calcio A 23187 (5 µM) y ácido araquidónico (10 µM). Todos los valores son concentraciones finales. Se llevaron a cabo controles negativos sin estimulación con ionóforo de calcio. Se incubó la mezcla de ensayo durante 15 min. a 37°C y se terminó añadiendo 100 µl de metanol que contenía HCl (1 M, al 3% v/v) y poniendo la placa de microtitulación en hielo. Tras la neutralización con 50 µl de PBS y centrifugación (340 x g) durante 10 min., se determinó la concentración de LTB₄ concentración en el sobrenadante.

- 35 Se midieron los efectos de las muestras y el compuesto de referencia [ref: 3] sobre la actividad de 5-LOX determinando la cantidad de leucotrieno B4 producida en condiciones de ensayo. Se realizó la cuantificación de

leucotrieno B₄ con El kit de inmunoensayo enzimático (EIA) de Cayman n.º 520111 (LTB₄). Se midieron las densidades ópticas a una longitud de onda= 415 nm. Se calcularon las cantidades usando una curva patrón de al menos 5 concentraciones diferentes. Se midieron los puntos de muestra como duplicados. Se expresaron los valores de inhibición relacionada con la dosis como un porcentaje de los valores de controles positivos. Si era aplicable, se determinaron los valores de CI₅₀ (correspondientes a la concentración de muestra a la que el nivel de inhibición es del 50%) con el programa GraphPad-Prism (versión 4, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

Ensayo de viabilidad en HL60 con WST-1

Función celular/mitocondria: se sometió a prueba la disminución de la actividad metabólica [ref: 4] en hepatocitos humanos (Hep G2), granulocitos humanos (HL60 diferenciadas), monocitos humanos (THP-1) y macrófagos humanos (THP-1 diferenciadas) con un kit de sal de tetrazolio WST-1 (Biovision, K301-500, CA, EE.UU.). Se preincubaron las células con extracto durante 24 horas.

Se midió la actividad metabólica de las células mediante la capacidad de las células vivas para reducir la sal de tetrazolio WST-1 a formazán. Se midió directamente la cantidad de formazán determinando la densidad óptica (DO) con un lector de placas (BioRad, EE.UU.) a una longitud de onda de A = 450 nm.

Se realizaron las mediciones ópticas como triplicados y se calcularon las desviaciones estándar. Para cada concentración de prueba, se restaron los valores de DO del blanco (mezcla de ensayo con muestras pero sin células) del promedio de las mediciones de DO con células. Se transformaron los valores de DO450 en valores en porcentaje con lecturas de viabilidad del 100% correspondientes a mediciones del control sin muestra.

Resultados

Los resultados para el ejemplo 2 se muestran en las figuras 2 y 3.

Valores de CI₅₀ obtenidos del ensayo de inhibición de 5-LOX:

Muestras de prueba

Muestra	Replicación	CI ₅₀ (µg/ml)	CI ₅₀ (µg/ml)	confianza del 95% (µg/ml)
ViP_Matr'07_78	1	0,30		de 0,06 a 2,84
ViP_Nig'07_8	1	3,00		de 1,33 a 10,76
ViP_Matr'07_78	2	0,38		de 0,21 a 0,68
ViP_Nig'07_8	2	3,02		de 1,57 a 5,82
Mezcla 1:1	1	0,53		de 0,23 a 1,24
Referencia	CI ₅₀ (nM)	Confianza del 95% (nM)		
Dexametasona	0,28	de 0,21 a 0,39		

25

Ejemplo 3 - Influencia de NICHA 001 sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer humanas

Se investigó la respuesta proliferativa de células de glioblastoma y cáncer de próstata células a diferentes concentraciones de NICHA. Se realizó cada experimento con aceite de *Nigella*, con aceite de manzanilla y con una combinación de ambos aceites.

Muestras

Muestras de prueba	Descripción	Proveedor	Art. n.º	Lote n.º	Número ViP
Aceite de <i>Nigella</i>	<i>Nigellae oleum</i>	Hänseler AG	26-4150-1	2006.08.0537	ViP_Nig'07_8
Aceite esencial de <i>Matricaria</i>	<i>Matricariae Aetheroleum</i> Farm.Eur.	Hänseler AG	1-4925-2	2006.09.0181	ViP_Matr'07_78

Ensayos

Ensayos	Líneas celulares	Muestras	Concentraciones de prueba
Síntesis de ADN	Células de cáncer de próstata	ViP_Nig'07_8	0,3/3/30 µg/ml
	DU145	ViP_Matr'07_78	0,3/3/30/60 µg/ml
	Células de glioblastoma	ViP_Nig'07_8	0,3/3/30 µg/ml
	U-87 MG	ViP_Matr'07_78	
		Mezcla	

5 Síntesis de ADN

Incorporación de ³H-timidina: Se cultivaron células DU145 y U-87MG mediante tripsinización y se sembraron a 10.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se incubaron las células con las muestras a las concentraciones requeridas durante 24 h y/o 48 h a 37°C y 5% de CO₂. Se pulsaron las células con ³H-timidina (1 µCi/ml) (Perkin Elmer) durante 24 horas. Tras ese tiempo, se lavaron con PBS y se fijaron dos veces con metanol durante 5 min. Se precipitó la proteína mediante TCA 0,3 N. Tras una etapa de lavado, se añadieron 150 µl de NaOH 0,3 N durante 15 min. para lisar las células. Se midieron controles de fondo con las muestras sin células.

Para detectar la ³H-timidina incorporada para la síntesis de ADN, se transfirieron las muestras a tubos de centelleo con cóctel de centelleo. Se realizó la cuantificación en un contador de centelleo líquido Tri-Carb 1900 TR (Packard, EE.UU.).

15 Se midió el efecto de varias concentraciones de muestras determinando la cantidad de radiomarcador (dpm) en las condiciones de ensayo. Se expresaron los valores relacionados con la dosis como un porcentaje de los valores de los controles positivos. Se midieron los puntos de muestra como cuadruplicados, se expresan los errores como desviaciones estándar.

Resultados obtenidos para células de cáncer de próstata DU145

20 Los resultados del efecto de NICHA sobre la síntesis de ADN en células de cáncer de próstata (DU145) se muestran en las figuras 4A-4D.

Los valores de CI₅₀ de los compuestos de referencia sobre la síntesis de ADN son los siguientes:

Referencia	Incubación durante 24 h		Incubación durante 48 h	
	CI ₅₀ (nM)	Confianza del 95% (nM)	CI ₅₀ (nM)	confianza del 95% (nM)
Camptotecina	152	de 115,9 a 199,4	7,5	de 5,1 a 11,0

25 Resultados obtenidos para células de glioblastoma U87MG

Los resultados del efecto de NICHA sobre la síntesis de ADN en células U-87MG (incubación durante 48 horas) se muestran en las figuras 5A-5C.

Los valores de CI₅₀ de los compuestos de referencia sobre la síntesis de ADN con células U-87MG son los siguientes:

Referencia	Incubación durante 48 h	
	CI ₅₀ (nM)	Confianza del 95% (nM)
Camptotecina	3,32	de 2,5 a 4,4

Conclusiones a partir de los resultados de los ejemplos

- 5 Se investigaron el aceite esencial de manzanilla (*Matricaria recutita*: ViP_Matr07_78) y el aceite de semillas de Neguilla (*Nigella sativa*: ViP_Nig07_8) con respecto a su potencial para inhibir la síntesis de leucotrienos en la línea celular de granulocitos humanos diferenciados HL 60 (leucemia mieloide aguda humana). El aceite de semillas de *Nigella sativa* mostró una impresionante inhibición de la actividad de 5-Lox con un valor de CI₅₀ de 3,02 ug/ml (ejemplo 2, figura 2d). Sorprendentemente, una mezcla de los compuestos inhibió la síntesis de leucotrienos en la línea celular de granulocitos HL60 más que lo aditivo. En lugar de la CI₅₀ esperada de 0,76 ug/ml, resultó una CI₅₀ de 0,53 ug/ml (ejemplo 2, figura 2e). Puede concluirse que una combinación de los dos compuestos potencia la actividad de los componentes individuales.
- 10 ViP_Matr07_78 mostró una actividad inhibidora mucho mayor incluso con respecto a la inhibición de la síntesis de leucotrienos y reveló un valor de CI₅₀ de 0,38 ug/ml (ejemplo 2, figura 2c). El aceite esencial de *Matricaria* parece ser por tanto un inhibidor de 5-LOX extremadamente potente.
- 15 Para evaluar si la actividad inhibidora observada es sólo un resultado de efectos citotóxicos, se incubaron las células con las concentraciones elegidas para los experimentos con 5-LOX y se midió la actividad mitocondrial (WST). Tal como se muestra en las figuras 3a y 3b, no se produjo citotoxicidad con ViP_Nig07_8 ni con ViP_Matr07_78 a las concentraciones elegidas (ejemplo 2, figuras 3a y 3b). Puede concluirse que la actividad observada para inhibir la síntesis de leucotrienos es un resultado de una interacción específica con la 5-lipooxigenasa.
- 20 También se obtuvieron resultados adicionales referentes a la liberación de interleucina 6 por la línea celular de macrófagos humanos THP1. Mientras que *Nigella sativa* no mostró actividad (ejemplo 1, figuras 1c y 1d), *Matricaria recutita* inhibió la liberación de interleucina 6 desde células THP1 de manera dependiente de la dosis y un valor de CI₅₀ de 5 ug/ml (ejemplo 1, figuras 1a y 1b)). Los experimentos de repetición (replicación 2) mostraron la reproducibilidad de los resultados de la replicación 1 (ejemplo 1).
- 25 Los resultados indican que el aceite esencial de *Matricaria recutita* revela una fuerte actividad inhibidora con respecto a la síntesis de leucotrienos en células de leucemia mieloide aguda humana HL60 (ejemplo 2, figura 2c). Además, los resultados indican que la liberación de interleucina 6 podía suprimirse en una línea celular de macrófagos humanos THP1 (ejemplo, figuras 1a y 1b).
- 30 Como las concentraciones necesarias para obtener el efecto de inhibición son considerablemente bajas, se especula que las dosis terapéuticamente eficaces se alcanzarán en el ser humano sin dificultad, especialmente ya que los aceites esenciales son sumamente lipófilos y deben absorberse fácilmente.
- Tomado junto con la característica del aceite esencial para inhibir eficazmente la formación de eicosanoides (leucotrienos) con concentraciones en el rango nanomolar en la línea celular de macrófagos humanos HL60, el aceite esencial de *Matricaria recutita* parece ser un candidato muy valioso para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias/autoinmunitarias y determinados tipos de cáncer.
- 35 Un tercer conjunto de experimentos (ejemplo 4) investigó si el aceite de semillas de *Nigella sativa* o el aceite volátil de *Matricaria recutita* inhibe la síntesis de ADN en la línea celular de cáncer de próstata DU 145 y la línea celular de glioblastoma U87MG *in vitro*. Mientras que *Matricaria recutita* (ViP_Matr07_78) inhibió ambas líneas celulares tras 48 horas con respecto a la síntesis de ADN de manera dependiente de la dosis (ejemplo 4, figura 4c), *Nigella sativa* (ViP_Nig07_8) no pudo mostrar un efecto inhibidor en ambas líneas celulares de cáncer (ejemplo 4, figura 4d).
- 40 Como se sabe que DU145 produce interleucina 6 como factor de crecimiento, parece probable que la supresión de la síntesis de ADN esté provocada (al menos parcialmente) por la actividad inhibidora sobre la liberación de interleucina 6 del aceite volátil de *Matricaria recutita*. La inhibición de la síntesis de ADN de la línea celular de glioblastoma U87MG es aparentemente un efecto de la fuerte supresión de la síntesis de leucotrienos por el aceite volátil de *Matricaria recutita*.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende
 - un extracto acuoso de flores de manzanilla, siendo este extracto acuoso un aceite volátil que puede obtenerse mediante un procedimiento de extracción que comprende una destilación con vapor de agua de flores de manzanilla, y
- 5 - aceite de neguilla
para el tratamiento de un estado proliferativo y/o inflamatorio.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que las flores de manzanilla son flores tubiformes.
3. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la destilación con vapor de agua se lleva a cabo a presión reducida.
- 10 4. Composición según la reivindicación 3, en la que la destilación con vapor se realiza bajo una atmósfera de nitrógeno y el procedimiento comprende además las etapas de
 - (i) poner en contacto la composición con una povidona reticulada que forma un complejo con cumarinas;
 - (ii) eliminar el complejo obtenido en la etapa (i); y
 - (iii) eliminar el agua poniendo en contacto la composición obtenida de la etapa (ii) con sulfato de sodio anhidro; y
 - 15 (iv) separar el sulfato de sodio de la composición obtenida en la etapa (iii).
5. Composición según la reivindicación 4, que está sustancialmente libre de agua, preferiblemente que contiene menos del 0,1% p/p de agua, lo más preferiblemente menos del 0,01% p/p de agua.
- 20 6. Composición según la reivindicación 5, que está sustancialmente libre de cumarinas, preferiblemente que contiene menos del 0,01% p/p, lo más preferiblemente menos del 0,005% p/p de cumarinas, calculado como 7-hidroxycumarina.
7. Composición según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, que contiene camazuleno en una cantidad del 5-15% p/p, más preferiblemente del 15-25% p/p, lo más preferiblemente del 20-30% p/p.
- 25 8. Composición según la reivindicación 1, en la que el aceite de neguilla es un aceite de neguilla purificado que puede obtenerse mediante un procedimiento de purificación que comprende las etapas de
 - (i) poner en contacto aceite de neguilla con una povidona reticulada que forma un complejo con compuestos fenólicos;
 - (ii) eliminar el complejo obtenido en la etapa (i); y
 - (iii) eliminar el agua poniendo en contacto el aceite de neguilla obtenido de la etapa (ii) con sulfato de sodio anhidro; y
 - 30 (iv) separar el sulfato de sodio del aceite de neguilla obtenido en la etapa (iii).
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, pudiéndose obtener la composición mediante ultrafiltración, preferiblemente usando un filtro que tiene un tamaño de poro de desde 0,001 hasta 0,02 μm , más preferiblemente de desde 0,001 hasta 0,01 μm .
- 35 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que está libre o esencialmente libre de endotoxinas, preferiblemente que contiene endotoxinas en una cantidad de 100 UE/ml (unidades de endotoxina por ml según Farm. Eur.) o menos, más preferiblemente 50 UE/ml o menos, aún más preferiblemente 10 UE/ml o menos.
- 40 11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que no contiene ningún material que tiene un peso molecular superior a 10.000, más preferiblemente ningún material que tiene un peso molecular superior a 1.000.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que está libre o esencialmente libre de compuestos seleccionados del grupo que consiste en cumarinas, flavonoides, siendo otros compuestos fenólicos impurezas típicas de manzanilla y/o neguilla, y agua residual.
- 45 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende adicionalmente palmitato de

ascorbilo y/o acetilcisteína.

14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende adicionalmente al menos un adyuvante farmacéutico, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en agentes farmacéuticos y excipientes farmacéuticos.
- 5 15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el tratamiento es mediante inyección o inhalación de la composición.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el estado es un estado inflamatorio, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Chron y esclerosis múltiple.
- 10 17. Composición según la reivindicación 1 a 15, en la que el estado es cáncer, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en glioblastoma, cáncer de pulmón y cáncer de próstata.
18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que el estado inflamatorio está causado por autoinmunopatía, preferiblemente desencadenado por interleucina 6, más preferiblemente desencadenado por leucotrienos, lo más preferiblemente dependiente de la presencia de interleucina 6 y/o leucotrienos.
- 15 19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y 17, en la que el estado está causado por un trastorno proliferativo, preferiblemente desencadenado por interleucina 6, más preferiblemente desencadenado por leucotrienos, lo más preferiblemente dependiente de la presencia de interleucina 6 y/o leucotrienos.
- 20 20. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un estado proliferativo y/o inflamatorio.
21. Uso según la reivindicación 20, en el que el tratamiento es según la reivindicación 15.
22. Uso según la reivindicación 20 ó 21, en el que el estado es según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.

▪ ViP_Matr'07_78

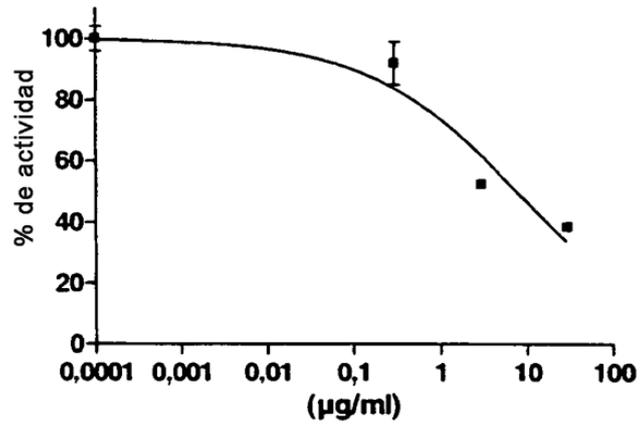


Fig. 1A

▪ ViP_Matr'07_78

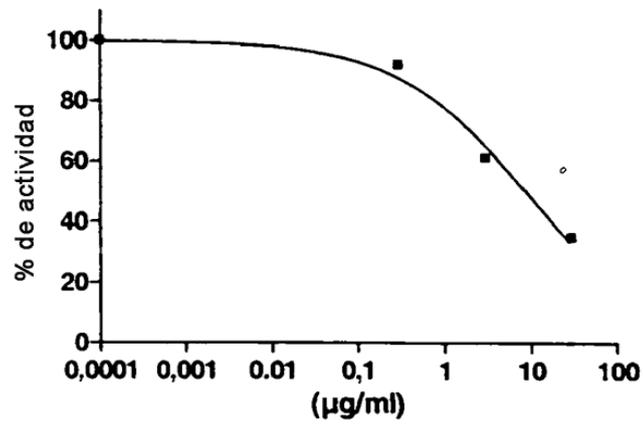


Fig. 1B

▪ ViP_Nig'07_8

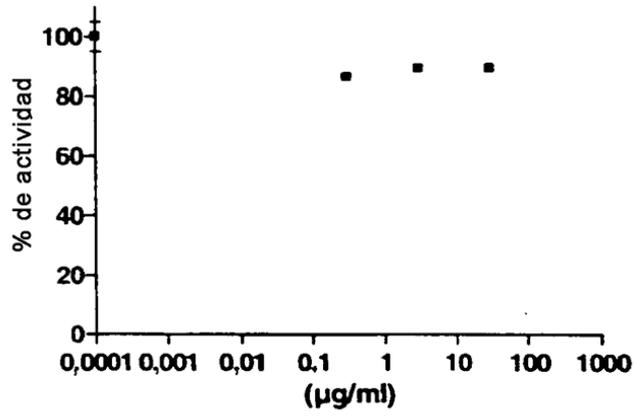


Fig. 1C

▪ ViP_Nig'07_8

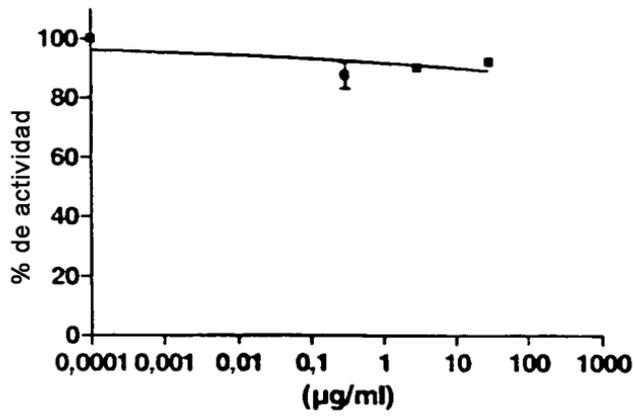


Fig. 1D

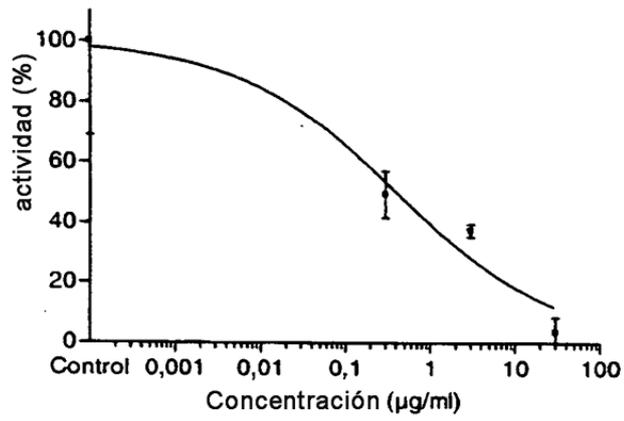


Fig. 2A

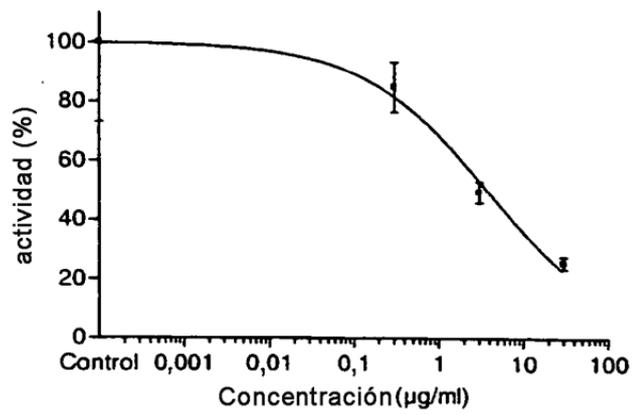


Fig. 2B

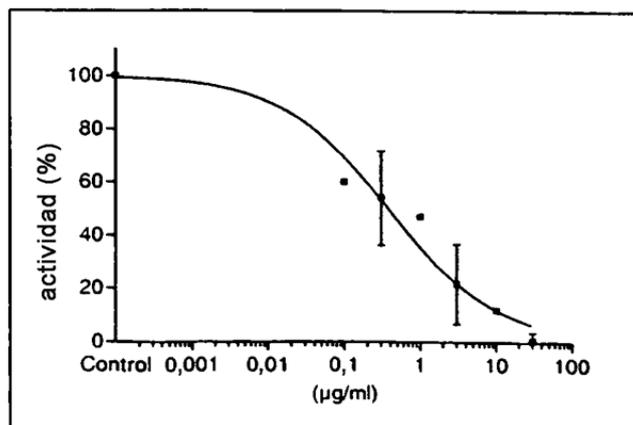


Fig. 2C

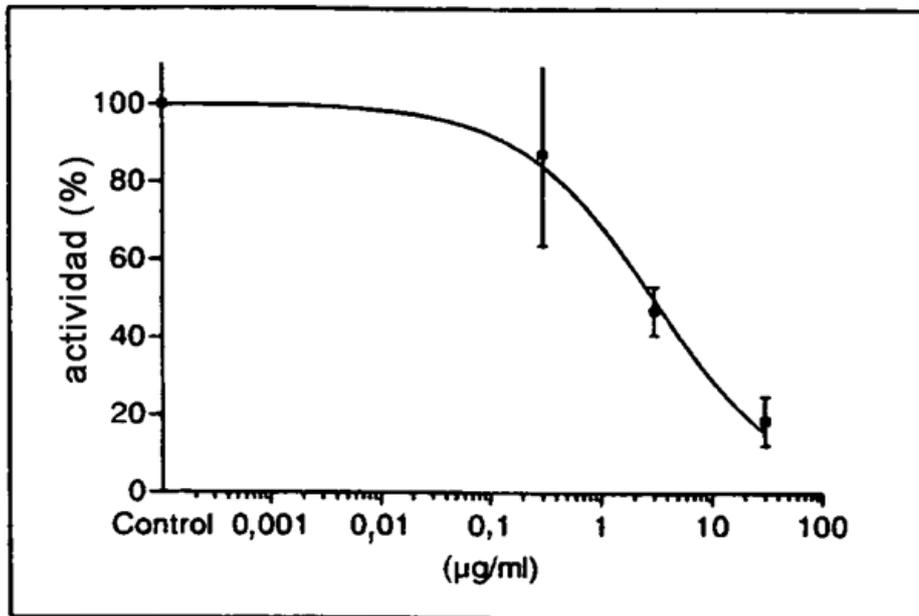


Fig. 2D

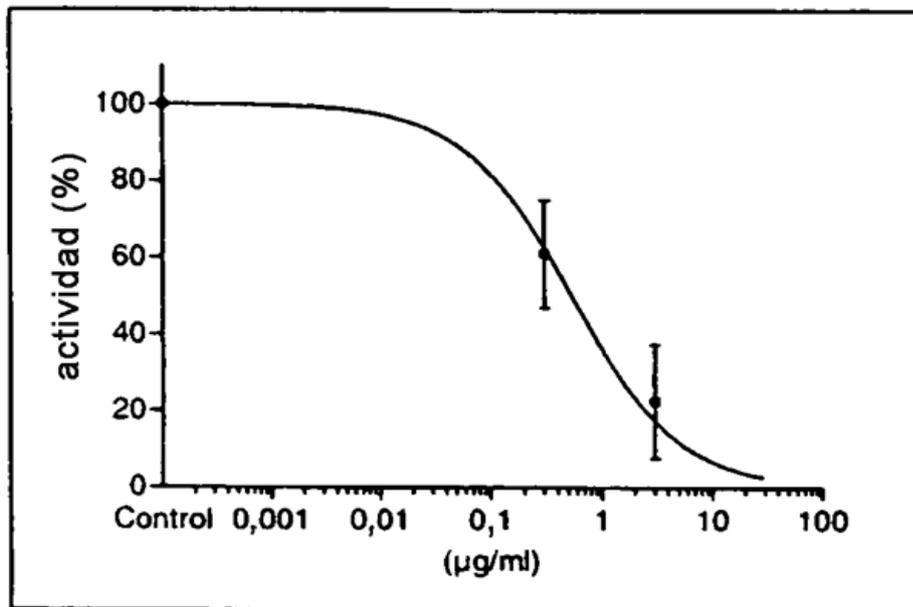


Fig. 2E

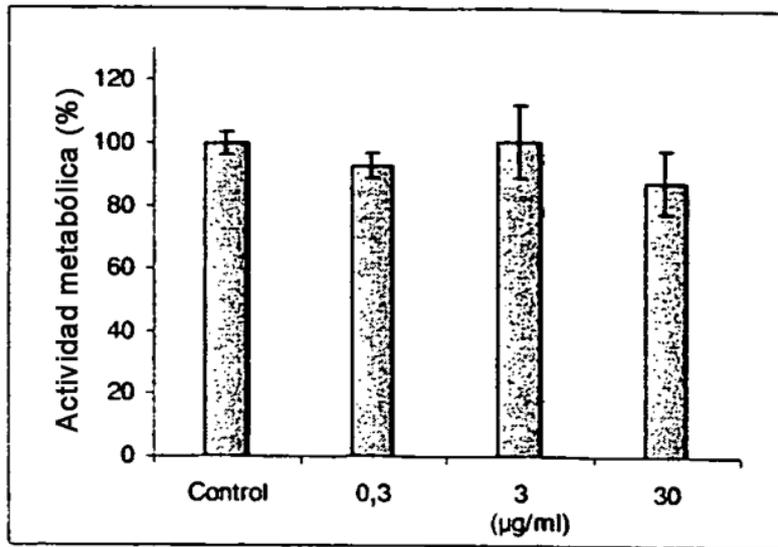


Fig. 3A

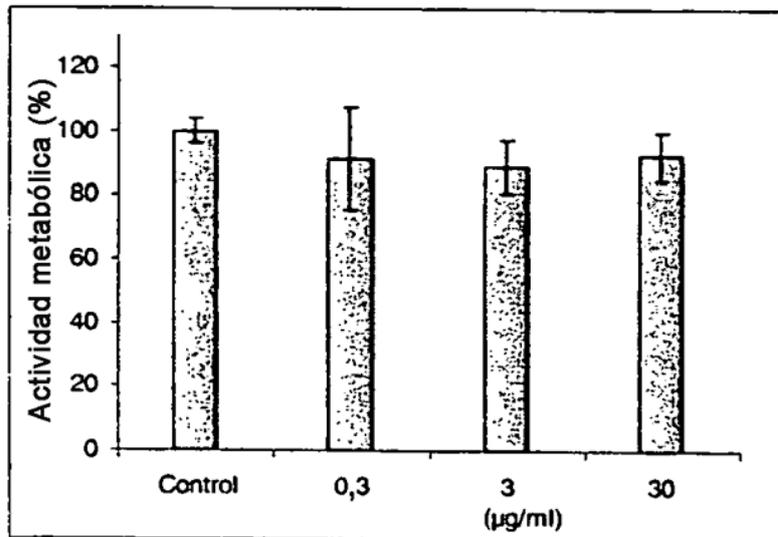


Fig. 3B

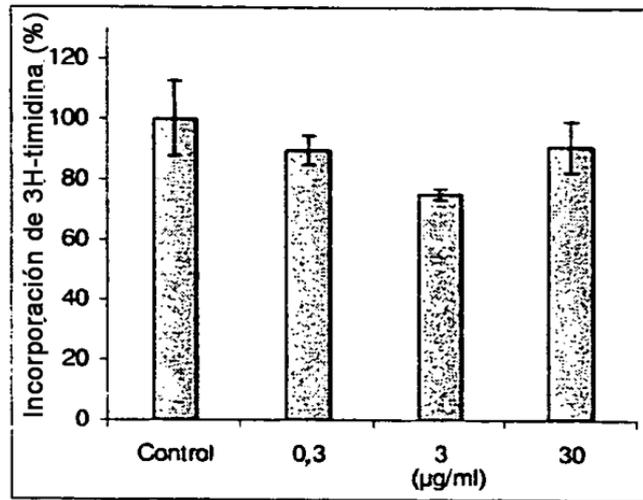


Fig. 4A

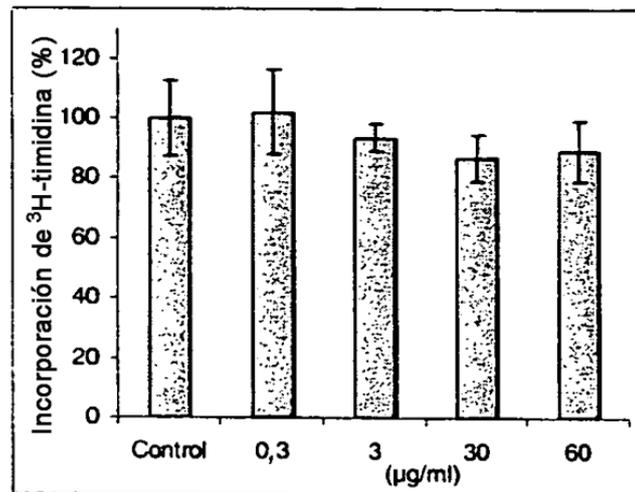


Fig. 4B

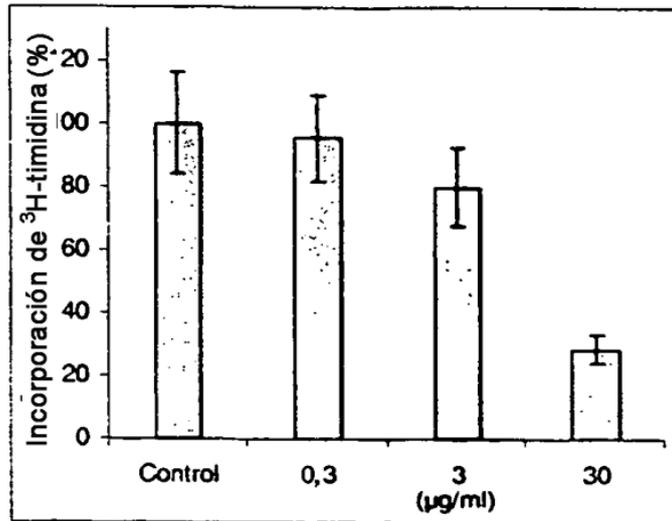


Fig. 4C

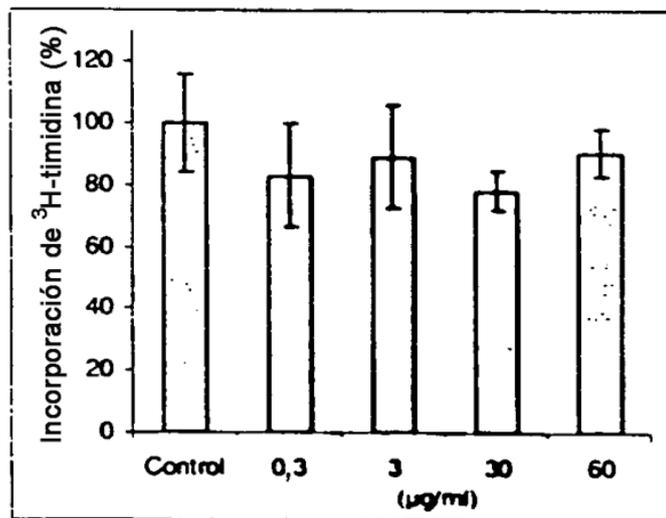


Fig. 4D

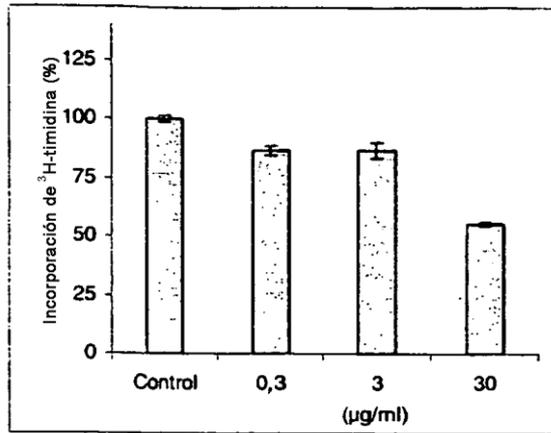


Fig. 5A

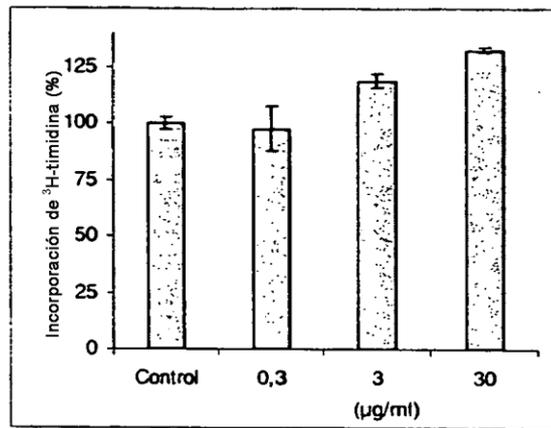


Fig. 5B

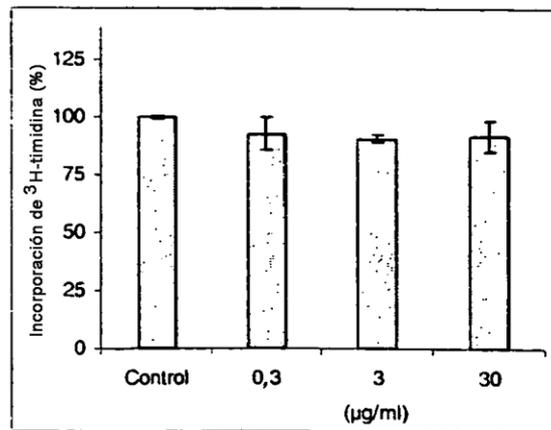


Fig. 5C