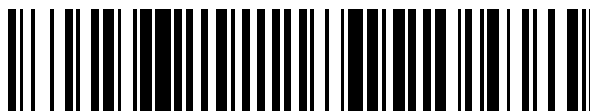


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 390**

51 Int. Cl.:

A61K 36/52 (2006.01)

A61P 31/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2005 E 05778486 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1789065**

54 Título: **Proceso de preparación de una fracción anti-microbiana a partir de Juglans regia**

30 Prioridad:

06.08.2004 US 599541 P

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

19.04.2013

73 Titular/es:

**INNOVUS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
4275 Executive Square, Suite 200
La Jolla CA 92037, US**

72 Inventor/es:

DAMAJ, BASSAM B.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 401 390 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

Proceso de preparación de una fracción anti-microbiana a partir de *Juglans regia*

Campo técnico

5 Esta invención se refiere a un proceso para preparar ingrediente(s) activo(s) de la composición de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, la extracción del o de los ingredientes activos de un producto natural.

Técnica anterior

10 Los productos para el cuidado de la salud que contienen uno o más compuestos biológicamente activos que existen en la naturaleza son muy conocidos. La presente invención se refiere a uno o más compuestos biológicamente activos que pueden obtenerse de una parte (por ejemplo, la raíz) de una variedad (variedad cultivada) de una especie del género *Juglans L.*, que es un miembro de la familia de plantas conocida como *Juglandaceae* (también referida como la "familia del nogal"). El género *Juglans L.* contiene más de diez especies, incluyendo, por ejemplo, *Juglans ailanthifolia Carr.* (nogal japonés P), *Juglans boliviana* (C. DC.), *Dode* (nogal boliviano P), *Juglans californica S. Wats.* (nogal del sur de California P), *Juglans cinerea L.* (nogal ceniciento P), y *Juglans neotropica Diels* (nogal de los Andes P).

15 Otra de las especies del género *Juglans L.* es *Juglans regia L.*, referida en la presente memoria como "*J. regia L.*" Existen numerosas variedades de nogales que son miembros de la especie *J. regia L.*, por ejemplo, los nogales cultivados en varias áreas geográficas en todo el mundo, incluyendo, por ejemplo, en América del Norte y del Sur, Asia, Europa y África. Una fuente del material biológicamente activo de la presente invención incluye partes de variedades seleccionadas, como se describe más adelante, de la especie de nogal *J. regia L.*

20 Descripción de la invención

Según la presente invención, se proporciona un proceso según la reivindicación 1 para extraer de una parte de una variedad de la especie de nogal *J. regia L.* un extracto biológicamente activo que comprende tratar la parte con un disolvente acuoso bajo condiciones de extracción y durante un periodo de tiempo suficiente para extraer de la parte una disolución acuosa que contiene en forma disuelta el extracto, en el que la variedad de *J. regia L.* se selecciona del grupo que consiste en nogales cultivados en Marruecos, España, Turquía, Afganistán, sur de Rusia, India, China, Grecia, Chile, Irán, Japón, Túnez, Argelia, Francia, Portugal, Sureste de Asia, Bangladesh, Bahrein, Iraq, Israel, Jordania, Kuwait, Líbano, Omán, Qatar, Siria, Emiratos Árabes Unidos (UAE), Yemen, Chipre, Armenia, Azerbaiyán, Georgia, Libia, Egipto, Sudán, Mauritania, Mali, Níger, Nigeria, Chad, y Etiopía, o dichos árboles cultivados en otras áreas geográficas. El término "extracto biológicamente activo" significa un extracto en el que cualquier parte de éste tiene uno o más de un efecto fisiológico, químico, farmacológico o biológico en el conjunto de un organismo o en una parte específica de un organismo o célula.

El disolvente acuoso usado para extraer el extracto biológicamente activo comprende una gran cantidad de agua, como se describe más adelante en la presente memoria.

35 De forma preferida, el extracto biológicamente activo se obtiene de una parte del nogal marroquí, preferiblemente de la corteza o raíz de éste.

La presente invención describe el suministro de una composición biológicamente activa que contiene una cantidad eficaz de uno o más compuestos presentes en el extracto biológicamente activo mencionado anteriormente, incluyendo, por ejemplo, composiciones que son capaces de funcionar como agentes anti-microbianos o agentes anti-fúngicos o agentes anti-cancerosos. Una forma ejemplar de la composición que se cree que se usará ampliamente es un enjuague bucal que contiene el extracto biológicamente activo, particularmente un enjuague bucal no alcohólico.

Descripción breve de los dibujos

Lo siguiente son dibujos que son ilustrativos de realizaciones de la invención y dibujos que contienen información comparativa.

45 La FIG. 1 representa una traza de cromatografía líquida de alta presión (de aquí en adelante "HPLC") de un extracto biológicamente activo preparado según la presente invención a partir de la raíz de un nogal marroquí..

La FIG. 2 representa una traza de HPLC de una mezcla de 5-hidroxi-1,4-naftoquinona y un extracto biológicamente activo preparado según la presente invención a partir de la raíz de un nogal marroquí.

50 La FIG. 3 representa una traza de HPLC de una mezcla de ácido tánico y un extracto biológicamente activo preparado según la presente invención a partir de la raíz de un nogal marroquí.

La FIG. 4 representa una traza de HPLC de un extracto biológicamente activo preparado según la presente invención a partir de la raíz de un nogal marroquí.

La FIG. 5 representa una traza de HPLC de un extracto preparado a partir de la raíz de un nogal cultivado en Arabia Saudita y que pertenece a la especie *J. regia* L.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

5 Una fuente del extracto biológicamente activo de la presente invención comprende una o más partes de árbol de variedades seleccionadas de las especies de nogal *J. regia* L. Aunque existen otras variedades de nogales de la especie *J. regia* L., los ejemplos de variedades de *J. regia* L. para uso en la presente invención son nogales que se cultivan en los siguientes países o regiones: Marruecos, España, Turquía, Afganistán, sur de Rusia, India, China, Grecia, Chile, Irán, Japón, Túnez, Argelia, Francia, Portugal, sureste de Asia, Bangladesh, Bahrein, Iraq, Israel, Jordania, Kuwait, Líbano, Omán, Qatar, Siria, Emiratos Árabes Unidos (UAE), Yemen, Chipre, Armenia, Azerbaiyán, 10 Georgia, Libia, Egipto, Sudán, Mauritania, Mali, Níger, Nigeria, Chad, y Etiopía, o dichos árboles cultivados en otras áreas geográficas. La especie de nogal *J. regia* L. también es conocida como el nogal “inglés”, el nogal “de los Cárpatos” y como el nogal “persa”.

Una fuente preferida del material biológicamente activo para uso en la composición de la presente invención es una parte del nogal marroquí, que incluye árboles cultivados que cubren un área de aproximadamente 7.600 Ha en Marruecos. Se ha indicado que más de la mitad de las plantaciones son plántulas que resultan del modo 15 predominante de propagación de semillas conocido por los agricultores. Los árboles se cultivan en áreas montañosas y remotas entre 800 y 1.800 m por encima del nivel del mar y bajo entornos diferentes que incluyen nogales cultivados que han resultado en la presencia de variabilidad genética. Usando el Análisis de Componente Principal en un total de 39 rasgos de nuez, grano y vegetativos en Marruecos, se han estudiado 55 plántulas de nogal marroquí y siete variedades y selecciones francesas. Los resultados muestran que la variabilidad genética existente se manifiesta por la longitud y diámetro de los brotes, tamaño de la nuez y pesos del grano y la cáscara. Los genotipos del norte de Marruecos (Montañas Rif) parecen representar un ecotipo separado caracterizado por un hábito de producción de fruto lateral y frutos pequeños. El germoplasma marroquí mostró frutos más pequeños, granos más secos, yemas con mayor proporción de fracaso y menor potencial de producción de frutos comparado con el 25 germoplasma francés.

La corteza de los nogales marroquíes es dulce y no comparte el sabor amargo agrio y/o olor de otras variedades de nogal; éstas son características distintivas del nogal marroquí.

Las partes preferidas del nogal para uso en la presente invención son las raíces y corteza de los árboles, lo más preferiblemente las raíces de los árboles. Como se describe con detalle más adelante, las partes se convierten 30 preferiblemente en un polvo machacando o moliendo antes de tratarlas con el disolvente acuoso para extraer de ellas los ingredientes activos.

Cualquier método adecuado que implica el uso del disolvente acuoso de la presente invención puede usarse para extraer los ingredientes biológicamente activos solubles en agua de las partes de los nogales mencionados anteriormente. Las condiciones de la extracción deben llevarse a cabo durante un periodo de tiempo suficiente para 35 producir un extracto líquido que contiene aproximadamente 20% en peso del extracto biológicamente activo disuelto en el disolvente acuoso. (A no ser que se indique otra cosa, “% en peso”, tal y como se usa en la presente memoria, significa porcentaje en peso basado en el peso total de la composición). Preferiblemente, el extracto biológicamente activo comprende aproximadamente 20% en peso de la disolución acuosa, por ejemplo 20 kg del extracto disuelto en 100 L de disolución acuosa.

40 Cualquier forma adecuada de la parte del nogal puede usarse en la extracción, por ejemplo, porciones de la parte. De forma preferida, la parte del nogal se seca y se reduce a un polvo, por ejemplo, por una operación de molienda o pulverización que implica someter a las raíces o corteza del nogal a molienda o machaqueo hasta partículas que pueden variar de tamaño en un rango relativamente amplio. Preferiblemente, se usa un polvo de partículas finas y el polvo se macera con el disolvente acuoso.

45 El disolvente acuoso para uso en la extracción comprende al menos aproximadamente 70% en peso de agua, preferiblemente al menos aproximadamente 90% en peso de agua, lo más preferiblemente aproximadamente 100% en peso de agua. Como la concentración de agua que comprende el disolvente acuoso está reducida, se reduce la eficacia biológica del extracto que se obtiene del tratamiento con cantidades menores de agua en el disolvente acuoso.

50 Debe apreciarse que el disolvente acuoso que se usa para preparar el extracto biológicamente activo de la presente invención es significativamente diferente de la saliva que tiene una composición única. Por ejemplo, la saliva es un material relativamente viscoso que contiene enzimas y tiene un pH que de media es aproximadamente 6 a aproximadamente 6,5. El agua, por ejemplo, agua desionizada, tiene un pH que de media es aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5, tiene una viscosidad menor que la saliva y no contiene las enzimas presentes en la saliva.

55 Un disolvente acuoso que comprende menos de aproximadamente 100 por ciento de agua puede incluir un material que funciona como un co-disolvente. Un ejemplo de dicho material es un alcohol tal como, por ejemplo, etanol o metanol. El disolvente acuoso puede comprender aproximadamente 90% en peso de agua y aproximadamente 10%

en peso de alcohol. El disolvente acuoso puede comprender aproximadamente 70% en peso de agua y aproximadamente 30% en peso de alcohol.

5 La extracción debe realizarse bajo condiciones de temperatura que reduzcan la tendencia de los ingredientes biológicamente activos que comprenden el extracto de descomponerse. Se recomienda que la temperatura del disolvente acuoso no sea mayor de aproximadamente 60°C y preferiblemente en el rango de aproximadamente 4°C a aproximadamente 20°C. Cuando el disolvente acuoso tiene una temperatura distinta de la ambiente o temperatura ambiente (aproximadamente 23°C), puede usarse un equipo para refrigeración o calentamiento para disminuir o elevar la temperatura del disolvente hasta la temperatura de operación deseada.

10 Las condiciones de extracción que implican poner en contacto las partes del nogal con el disolvente acuoso a la temperatura deseada deben llevarse a cabo durante un periodo de tiempo suficiente para producir una disolución acuosa que tiene la concentración deseada del extracto biológicamente activo disuelto, por ejemplo, aproximadamente 20% en peso. Puesto que los materiales biológicamente activos solubles en agua que comprenden el extracto están presentes en la parte del nogal en cantidades muy pequeñas, por ejemplo, menos de aproximadamente 10% en peso, se necesitan cantidades relativamente grandes de disolvente acuoso y periodos de tiempo relativamente largos para llegar a la concentración deseada de extracto en la disolución acuosa concentrada que se produce por la extracción. Por ejemplo, en el tratamiento de las raíces de un nogal marroquí, aproximadamente 1.000 kg de las raíces pueden tratarse durante un periodo de aproximadamente 100 días con un disolvente acuoso que comprende sustancialmente todo agua a una temperatura de aproximadamente 4°C para producir una disolución acuosa concentrada del extracto que comprende aproximadamente 20% en peso de extracto biológicamente activo. Las condiciones de la extracción pueden incluir tratar la parte con el disolvente acuoso a una temperatura del disolvente de aproximadamente 4°C a aproximadamente 20°C durante un periodo de tiempo suficiente para extraer de la parte una disolución acuosa que contiene en forma disuelta al menos aproximadamente 20% en peso del extracto biológicamente activo. Las condiciones de la extracción pueden incluir tratar la parte con el disolvente acuoso a una temperatura del disolvente de aproximadamente 4°C durante un periodo de tiempo suficiente para extraer de la parte una disolución acuosa que contiene en forma disuelta al menos aproximadamente 20% en peso del extracto biológicamente activo

Un proceso recomendado para proporcionar la disolución acuosa concentrada del extracto implica un proceso con múltiples etapas en el que un polvo de la parte del nogal se mezcla con el disolvente acuoso durante un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, uno a dos días) después de lo cual la disolución acuosa resultante (de aquí en adelante "disolución 1") se separa del polvo (de aquí en adelante "residuo en polvo") con prensado. El residuo en polvo que contiene ingredientes activos solubles en agua "sobrantes" se pone en contacto con disolvente acuoso adicional durante un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo uno a dos días) con agitación, después de lo cual el disolvente acuoso se separa del polvo de residuo con prensado y la disolución acuosa resultante que contiene los ingredientes biológicamente activos disueltos se añade a la "disolución 1" mencionada anteriormente junto con una cantidad adicional de polvo de la parte del nogal. Estas diferentes etapas pueden repetirse hasta que se obtiene la cantidad deseada de extracto biológicamente activo. El extracto en forma de polvo sólido puede recuperarse de la disolución evaporando el disolvente líquido. Antes de la evaporación, la disolución puede filtrarse, según pueda necesitarse, para eliminar de ella impurezas sólidas.

40 La invención incluye en su alcance el uso de compuestos que comprenden el extracto biológicamente activo, incluyendo compuestos que comprenden la fracción anti-microbiana del extracto y formas sintéticas de dichos compuestos, esto es, dichos compuestos preparados por síntesis apropiada.

El Ejemplo No. 1 siguiente describe un proceso preferido para preparar un extracto biológicamente activo preferido de la presente invención. La FIG. 1 es una traza de HPLC del extracto preferido. La traza incluye aproximadamente 75 fracciones que representan compuestos contenidos en el extracto. El extracto que es el sujeto de la traza de la FIG. 1 puede usarse en una composición anti-cancerosa como se describe más adelante.

La traza de la FIG. 1 también incluye la identificación de la fracción anti-microbiana del extracto, como se describe más adelante. La fracción anti-microbiana puede separarse del extracto por cromatografía líquida como se describe en el Ejemplo No. 2 más adelante y puede usarse en composiciones anti-microbianas como se describe más adelante.

50 Como se describe en el Ejemplo No. 1, el extracto biológicamente activo se obtuvo de las raíces del nogal marroquí. El procedimiento de HPLC que se usó para llegar a la traza de "extracto" de la FIG. 1 se describe más adelante en la presente memoria. Se diluyó una muestra de 4,9 ml de la disolución al 20% en peso del extracto del Ejemplo No. 1 hasta 100 ml con agua destilada. La cromatografía se realizó usando una columna C18 (Vydac C18 (218TP54), 4,6 x 250 mm). La columna se equilibró con 0,1% TFA-Agua (v/v) (Tampón A) y el concentrado se eluyó con 0,1% TFA-60% acetonitrilo-agua (v/v) (Tampón B) a 1,2 mL/minuto con un gradiente de 0% B durante 10 minutos, 0-100% B en 100 minutos. La elución se monitorizó por absorbancia a 254 nm, como se produjo la traza de la FIG. 1.

Las 75 fracciones mostradas en la traza de la FIG. 1 y en la forma de disoluciones líquidas se aislaron, se evaporaron y se pesaron antes de analizar para actividad microbiana. Las muestras de cada una de las fracciones se resuspendieron en agua hasta una concentración normalizada de 1 mg/ml. De las 75 fracciones ensayadas, 17

fracciones mostraron algún nivel de actividad anti-microbiana. Las fracciones Nos. 34 y 35 mostraron una inhibición fuerte (R=9 a 11 mm, para *E. coli*), la fracción No. 36 mostró una inhibición de potencia intermedia (R=3 a 5 mm) y las fracciones Nos. 1, 2, 26, 32, 37, 40, 46, 47, 49, 58, 59, 60, 67, y 70 mostraron una inhibición débil (R<3 mm). Las 17 fracciones mencionadas anteriormente se refieren en la presente memoria como la "fracción anti-microbiana" del extracto de la presente invención. Los compuestos que comprenden las fracciones Nos. 34, 35, y 36 se prefirieron para uso en aplicaciones anti-microbianas.

La fracción anti-microbiana de la presente invención puede usarse para formular composiciones que son eficaces para tratar afecciones que implican infecciones microbianas. La infección microbiana puede estar presente en un ser humano u otros mamíferos o no mamíferos. Como es evidente en la sección de Ejemplos de la presente memoria, la fracción anti-microbiana es eficaz para inhibir el crecimiento de una variedad de cepas bacterianas. Los ejemplos de composiciones en las que puede usarse la fracción anti-microbiana incluyen enjuague bucales, aplicaciones tópicas anti-bacterianas, y cualesquiera otras afecciones o enfermedades que implican infección microbiana que puede aliviarse por el uso de la fracción anti-microbiana de la presente memoria. Puede usarse cualquier forma adecuada de la composición. Los ejemplos de dichas formas son una disolución acuosa, una crema, jabón, pomada, gel, polvo hidratado y un comprimido. La composición puede administrarse en cualquier forma adecuada, por ejemplo, por administración oral, por administración tópica, tal como por el uso de un parche o pulverizador, o por cualquier otro modo de sistema de administración que presente la composición al microbio en cuestión. La composición anti-microbiana comprende típicamente otros ingredientes, por ejemplo, estabilizadores, tensioactivos, colorantes, fragancias y anti-microbianos adicionales o cualquier ingrediente necesario para hacer una formulación final deseada y adecuada para los usos indicados anteriormente.

La fracción anti-microbiana debe estar presente en la composición en una cantidad eficaz para impedir el crecimiento del microbio. La cantidad dependerá generalmente de varios factores, incluyendo, por ejemplo, la naturaleza de la cepa bacteriana y su resistencia y el sitio de la infección. Se cree que para la mayoría de las aplicaciones, la cantidad de la fracción anti-microbiana comprenderá de aproximadamente 1 a aproximadamente 100% en peso de la composición, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de la composición.

Se cree que una forma usada popularmente de la fracción anti-microbiana de la presente invención será en composiciones de enjuague oral, incluyendo enjuagues bucales, que no tienen alcohol o sustancialmente no tienen alcohol, esto es, la concentración de alcohol no es mayor de aproximadamente 0,1% en peso. Un ventaja asociada con el uso de dichas composiciones es que se consideran más sanas que las composiciones que contienen alcohol.

Como se ha mencionado anteriormente, el extracto biológicamente activo que contiene la fracción anti-microbiana de la presente invención puede usarse para tratar infecciones fúngicas. La infección fúngica puede estar presente en un ser humano u otros mamíferos o no mamíferos. Pueden tratarse varios tipos de infecciones fúngicas. Los ejemplos de infecciones fúngicas comunes que pueden tratarse son aquellas causadas por: *Candida albicans*, *Malassezia furfur*, *Madurella mycetomatis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, y *Aspergillus fumigatus*. La sección de Ejemplos de la presente memoria incluye datos experimentales que muestran el tratamiento eficaz de *Candida albicans*.

Los ejemplos de composiciones en las que puede usarse el extracto biológicamente activo incluyen enjuagues bucales, enjuagues anti-fúngicos orales y vaginales, aplicaciones anti-fúngicas tópicas, y cualesquiera otras afecciones o enfermedades que implican infecciones fúngicas que pueden aliviarse por el uso del extracto biológicamente activo de la presente memoria. Puede usarse cualquier forma adecuada de la composición. Los ejemplos de dichas formas son una disolución acuosa, una crema, jabón, pomada, gel, polvo hidratado y un comprimido. La composición puede administrarse en cualquier forma adecuada, por ejemplo, por administración oral, por administración tópica, tal como por el uso de un parche o pulverizador, o por cualquier otro modo de sistema de administración que presente la composición al hongo en cuestión. La composición anti-fúngica comprende típicamente otros ingredientes, por ejemplo, estabilizadores, tensioactivos, colorantes, fragancias y anti-fúngicos adicionales o cualquier ingrediente necesario para hacer una formulación final deseada y adecuada para los usos indicados anteriormente.

El extracto biológicamente activo debe estar presente en la composición en una cantidad eficaz para impedir el crecimiento del hongo. La cantidad dependerá generalmente de varios factores, incluyendo, por ejemplo, la naturaleza de la cepa fúngica y su resistencia y el sitio de la infección. Se cree que para la mayoría de las aplicaciones, la cantidad del extracto biológicamente activo comprenderá de aproximadamente 1 a aproximadamente 100% en peso de la composición.

Como se ha mencionado anteriormente, el extracto biológicamente activo que contiene la fracción anti-microbiana de la presente invención puede usarse para tratar cáncer. El cáncer puede estar presente en un ser humano u otros mamíferos o no mamíferos. Pueden tratarse varios tipos de cáncer (véase internet, www.nci.nih.gov. Lista de A a Z de Cánceres). Los ejemplos de tipos de cáncer comunes que pueden tratarse son: cáncer de vejiga; cáncer de mama; cáncer de colon y rectal; cáncer endometrial; cáncer de riñón (cáncer renal); leucemia; cáncer de pulmón; melanoma; linfoma no de Hodgkin; cáncer de próstata; cáncer pancreático. El ejemplo referencia 5 incluye datos experimentales que muestran el tratamiento eficaz de células de cáncer de mama.

El extracto se administra en una cantidad suficiente para impedir el desarrollo inicial o continuado del cáncer; puede administrarse durante un periodo de tiempo suficiente para parar el crecimiento de las células cancerosas o para matar a las células cancerosas. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "cantidad suficiente" significa una cantidad que es eficaz para inducir la muerte o parar el crecimiento de las células cancerosas. El extracto debe administrarse según un régimen de dosificación deseado para proporcionar la actividad terapéutica deseada. Debe apreciarse que la dosificación y los regímenes de dosificación adecuados dependerán de varios factores, incluyendo, por ejemplo, el cáncer particular que se está tratando, la gravedad de la afección y la salud general, edad y peso del sujeto.

El extracto puede administrarse en una dosis única o en una serie de dosis. Las dosificaciones ejemplares están en el rango de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1.000 mg/kg de peso corporal por dosificación.

Aunque el extracto biológicamente activo puede administrarse sin mezclar, se administra preferiblemente en la forma de una composición farmacéutica que contiene uno o más excipientes del tipo conocido por los expertos en la técnica. Pueden usarse cualesquiera formas adecuadas de la composición. Los ejemplos de dichas formas son una disolución acuosa, pastilla, cápsula y un comprimido. La composición puede administrarse por administración oral, o por cualquier otro modo de sistema de administración que presente la composición a las células cancerosas en cuestión. La composición puede contener cualesquiera vehículos o diluyentes adecuados, por ejemplo, disolventes, medios de dispersión, rellenos, vehículos sólidos, recubrimientos, agentes anti-fúngicos y anti-bacterianos, agentes de penetración dérmica, tensioactivos, agentes isotónicos y de absorción y semejantes. Debe entenderse que la composición también puede incluir otros agentes biológicamente activos adicionales.

El extracto biológicamente activo también puede incluirse en una composición alimenticia para administración al sujeto. La composición alimenticia puede producirse usando varios materiales alimenticios adecuados. Los ejemplos de materiales alimenticios son arroz, trigo, maíz, patata, batata, harina de soja, harina de alga marina (laminaria, wakame (*Undaria pinnatifida*), agar-agar, etc.), almidón, jarabe, lactosa, glucosa, fructosa, sacarosa, manitol y semejantes. Estos materiales pueden usarse solos o en combinación adecuada entre sí. La composición alimenticia puede prepararse en una forma deseada, si es necesario, añadiendo agua o semejantes. Además, pueden añadirse adecuadamente agentes saporíferos, agentes colorantes, agentes edulcorantes, aceites comestibles, vitaminas y semejantes a la composición alimenticia.

La FIG. 2 de la presente memoria contiene información que muestra que un compuesto de la técnica anterior que se indica que tiene propiedades germicidas y que se obtiene de parte de un nogal no es un compuesto que está contenido en la fracción anti-microbiana de la presente invención. El compuesto de la técnica anterior es 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (de aquí en adelante por conveniencia "la quinona") que se describe en la Patente U.S. No. 5.137.717 de Wixforth como que tiene propiedades germicidas y que se describe para uso en varios tipos de preparaciones anti-germicidas, por ejemplo, un enjuague bucal. La patente de Wixforth describe que la quinona está presente en un extracto que se obtiene de una parte de una planta (por ejemplo, la corteza de un árbol) que pertenece a la familia *Juglandaceae* y el género *Juglans L.*, por ejemplo, las especies *J. regia L.* y *J. nigra L.* La patente de Wixforth no identifica ninguna variedad de nogal que pertenezca a las especies mencionadas anteriormente; los ejemplos de la patente se refieren generalmente al uso de raíz o corteza de *J. regia L.* para obtener la quinona. La extracción usada para obtener la quinona se describe en la patente como que implica el uso de un agente de extracción que comprende 70% a 100% de etanol y 0% a 30% de agua.

La FIG. 2 es una traza de HPLC de la fracción anti-microbiana de la presente invención como se describe en el Ejemplo No. 1 más adelante mezclada con la quinona. La cromatografía se realizó usando una columna C18 (Vydac C18 (218TP54), 4,6 x 250 mm). La columna se equilibró con 0,1% TFA-Agua (v/v) (Tampón A) y el concentrado se eluyó con 0,1% TFA-60% acetonitrilo-agua (v/v) (Tampón B) a 1.2 mL/minuto con un gradiente de 0% B durante 10 minutos, 0-100% B en 100 minutos. La elución se monitorizó por absorbancia a 210 nm. La traza muestra que 5-hidroxi-1,4-naftoquinona eluye en estas condiciones a los 47,11 minutos y no está contenida en la fracción anti-microbiana de la presente invención que eluye en estas condiciones a los 23,5 a 31,5 minutos.

La FIG. 3 de la presente memoria contiene información que muestra que un extracto de la técnica anterior que puede obtenerse por el uso de un disolvente acuoso a partir de la parte de un nogal de la especie *J. regia L.* es un extracto que es diferente de la fracción anti-microbiana de la presente invención. El extracto de la técnica anterior comprende tanino que se describe en la solicitud de patente europea publicada EP 1 323 354 como que puede extraerse por el uso de un disolvente acuoso de partes de un nogal que pertenece a la especie *J. regia L.* El extracto se describe como que tiene la capacidad de afectar la composición de microorganismos en el canal intestinal en animales monogástricos. La solicitud europea publicada no identifica la variedad de nogal que es la fuente del extracto.

La FIG. 3 es una traza de HPLC de una fracción anti-microbiana de la presente invención como se describe en el Ejemplo No. 1 más adelante mezclada con ácido tánico. La información en la traza se obtuvo por el uso de un procedimiento que es similar al procedimiento descrito anteriormente en conexión con la traza de la FIG. 2, excepto que la elución se monitorizó por absorbancia a 254 nm. El ácido tánico se obtuvo de Sigma Aldrich (Missouri, EEUU), producto No. T-0200 y se usó sin ninguna purificación. La traza muestra que el ácido tánico está compuesto por varias fracciones y que las fracciones activas del extracto biológicamente activo de la presente invención no están contenidas en las fracciones del ácido tánico.

Una comparación de las trazas de las FIGS. 4 y 5 de la presente memoria muestra que existe una diferencia en la preparación del extracto biológicamente activo de la presente invención (FIG. 4) y un extracto obtenido de una variedad de nogal que no está en el alcance de la presente invención, esto es, un nogal cultivado en Arabia Saudita. El extracto que es el sujeto de la traza de la FIG. 4 es el Extracto del Ejemplo No. 1 más adelante. El extracto de la traza de la FIG. 5 se preparó usando los procedimientos del Ejemplo No. 1 más adelante, excepto que el extracto se obtuvo de un nogal cultivado en Arabia Saudita, no del nogal cultivado en Marruecos, que es la fuente del extracto biológicamente activo del Ejemplo No. 1.

Respecto a las trazas de HPLC de las FIGS. 4 y 5, la cromatografía se realizó usando una columna C18 (Vydac C18 (218TP54), 4,6 x 250 mm). La columna se equilibró con 0,1% TFA-Agua (v/v) (Tampón A) y el concentrado se eluyó con 0,1% TFA-60% acetonitrilo-agua (v/v) (Tampón B) a 1.2 mL/minuto con un gradiente de 0% B durante 10 minutos, 0-100% B en 100 minutos. La elución se monitorizó por absorbancia a 210 nm.

Una comparación de las trazas de las FIGS. 4 y 5 de la presente memoria muestra que la composición química del extracto biológicamente activo de la presente invención no es la del extracto preparado a partir del nogal cultivado en Arabia Saudita. Los picos de HPLC que corresponden a la composición química de la fracción anti-microbiana aparecen a un tiempo de retención entre 26 y 30 minutos y son completamente distintos de los del extracto de un nogal cultivado en Arabia Saudita; los picos de HPLC que corresponden al extracto de un nogal cultivado en Arabia Saudita aparecen a tiempos de retención de 0 a 25 y 31 a 38 minutos.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de realizaciones de la presente invención. También se muestran ejemplos comparativos.

Ejemplo No. 1

El procedimiento siguiente se usó para preparar un extracto biológicamente activo a partir de las raíces de un nogal marroquí según la presente invención.

Una cantidad suficiente de las raíces se secó con un secador comercial y se machacó con un triturador comercial para formar un polvo número 10. Veinte kg del polvo se añadieron a 200 L de agua desionizada en un tanque refrigerado de 600 L equipado con un mezclador comercial y la mezcla resultante se agitó durante 48 horas a 4°C. La mezcla se prensó usando una prensa comercial de 40 mesh perforada para recuperar 150 L de un primer extracto líquido que contiene ingredientes solubles en agua de la raíz al separarse el extracto líquido del residuo en polvo (de aquí en adelante "etapa uno"). Se añadieron cincuenta L de agua al residuo en polvo (aproximadamente 180 kg) del prensado del primer extracto y la mezcla se agitó durante 48 horas a 4°C. La mezcla se prensó como se ha descrito anteriormente y se añadió al primer extracto (de aquí en adelante "etapa dos"). Se recuperaron cincuenta L de un segundo extracto líquido. Se añadieron 20 kg de polvo de raíz adicionales a los 200 L del primer y segundo extractos líquidos. La mezcla resultante se agitó durante 48 horas a 4°C. La mezcla se prensó para recuperar 150 L de un tercer extracto líquido (de aquí en adelante "etapa tres"). Se añadieron cincuenta L de agua al residuo en polvo del prensado del tercer extracto líquido y la mezcla resultante se agitó durante 48 horas a 4°C. La mezcla se prensó para recuperar 50 L de un cuarto extracto (de aquí en adelante "etapa cuatro").

El ciclo que comprende la tercera y cuarta etapas se repitió 48 veces obteniéndose cada vez una disolución líquida concentrada (aproximadamente 150 L); comprendió aproximadamente 20 g del extracto biológicamente activo por 100 L de disolución acuosa de extracto (aproximadamente 20% en peso). La disolución líquida concentrada se filtró a través de un sistema de filtración en serie usando filtros con un tamaño de 60 micrómetros a 0,22 micrómetros para eliminar impurezas y esterilizar el extracto.

El ejemplo siguiente es ilustrativo de un enjuague bucal que está en el alcance de la presente invención y que se prepara a partir del extracto biológicamente activo del Ejemplo No. 1; así, incluye la fracción anti-microbiana de la presente invención.

Ejemplo No. 2

El enjuague bucal de este ejemplo comprendió los ingredientes siguientes.

	<u>% en peso</u>
extracto biológicamente activo del Ejemplo No. 1	20,0
timol	0,012
mentol	0,008
sorbitol	5,0
PEG-40	0,15

	polisorbato 80	1,0
	cloruro de cetil piridio	0,2
	ácido benzoico	0,125
	fragancia	2,5
5	sacarina sódica	0,002
	colorante	0,002
	sabor	c.s
	agua desionizada, hasta	c.s

10 El enjuague bucal del Ejemplo No. 2 se preparó mezclando inicialmente todos los ingredientes conjuntamente, excepto el polisorbato 80 y PEG-40, que son los últimos ingredientes añadidos a la mezcla.

El ejemplo siguiente se refiere a la evaluación de la actividad anti-microbiana del extracto de la presente invención frente a 13 cepas de bacterias del tipo que podría estar presente en todo el cuerpo.

Ejemplo No. 3

15 Este ejemplo implicó el uso de dos extractos biológicamente activos de la presente invención. Uno de los extractos se preparó por el procedimiento que implica sólo la etapa uno y la etapa dos como se ha descrito en el Ejemplo No. 1 de la presente memoria. Este extracto se describe en la presente memoria como "el Extracto 1x". El otro extracto se preparó siguiendo las etapas uno a cuatro como se ha descrito en el Ejemplo No. 1 y repitiendo la etapa tres y la etapa cuatro 13 veces. Este extracto se describe en la presente memoria como "el Extracto 15x". De acuerdo con esto, la concentración de los ingredientes que comprenden el Extracto 15x fue sustancialmente mayor que la concentración de los ingredientes que comprenden el Extracto 1x.

20 Cada cepa de bacterias implicada en el ensayo se cultivó incubando las cepas en placas de agar de 75 mm con 200 µl de caldo líquido. Se añadieron veinte µl del Extracto 1x a discos de papel blanco de 6 mm (BBL) de Becton Dickinson & Co. y se dejaron secar. Se pusieron cuatro discos secos de papel de 6 mm BBL (Becton and Dickinson and Company) que contienen el Extracto 1x en cada una de las placas de agar inoculadas con bacterias. Cada cepa de bacterias se incubó toda la noche a 37°C en un incubador modelo VWR, después de lo cual se midió el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento alrededor de los discos. Para cepa de bacterias, hubo un control que implicó el cultivo de las cepas mencionado anteriormente, pero el tratamiento del extracto se reemplazó por alcohol al 70% o medio de caldo líquido. El procedimiento mencionado anteriormente se repitió para el Extracto 15x.

30 La Tabla 1 siguiente lista el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento alrededor de los discos para el Extracto 1x y el Extracto 15x, el diámetro del cultivo control y el porcentaje total de inhibición del cultivo bacteriano por el Extracto 1x y el Extracto 15x. El porcentaje total de inhibición se calculó restando la medición de la zona de inhibición del crecimiento del control, dividiendo ese número por el control y multiplicando ese número por 100.

Tabla 1

Bacterias	Diámetro (mm) Extracto 1x	Diámetro (mm) Extracto 15x	Diámetro (mm) Control	% de Inhibición Extracto 1x	% de Inhibición Extracto 15x
<i>B. forsythus</i>	7,05	3,30	9,8	28,06	66,33
<i>E. Coli</i>	6,95	3,74	9,94	30,08	62,37
<i>Fusobacterium</i>	5,83	3,90	8,98	35,08	56,57
<i>Haemophilus</i>	5,65	4,29	9,27	39,05	53,72
<i>K. pneumoneae</i>	6,45	3,53	9,36	31,09	62,29
<i>P. aeruginosa</i>	6,74	3,66	9,64	30,08	62,033
<i>P. gingivalis</i>	6,77	3,86	9,96	32,03	61,24

Bacterias	Diámetro (mm) Extracto 1x	Diámetro (mm) Extracto 15x	Diámetro (mm) Control	% de Inhibición Extracto 1x	% de Inhibición Extracto 15x
<i>P. intermedia</i>	6,56	4,23	9,94	34,00	57,44
<i>S. aureus</i>	6,50	4,54	10,01	35,06	54,64
<i>S. pneumoneae</i>	6,02	3,62	8,99	33,04	59,73
<i>T. denticola</i>	6,44	3,47	9,21	30,08	62,32
<i>T. sokranskii</i>	6,37	4,09	9,52	33,09	57,04
Veillonella	6,43	3,24	9,17	29,88	64,67

La Tabla 1 anterior muestra que el Extracto 1x y el Extracto 15x tuvieron un efecto inhibitorio en cada una de las 13 cepas de bacterias identificadas anteriormente.

El ejemplo siguiente ilustra el efecto anti-fúngico del extracto de la presente invención.

5 Ejemplo No. 4

El procedimiento siguiente se usó para ensayar la actividad anti-fúngica de un extracto biológicamente activo de la presente invención frente al hongo *Candida albicans*. El procedimiento implicó el uso del ensayo de la Concentración Mínima Inhibidora (MIC); se usó para determinar la concentración más baja del extracto biológicamente activo que inhibirá el crecimiento del hongo. El ensayo se realizó según el método estándar descrito en el Manual de Microbiología Clínica, "Susceptibility Testing of Microdilution and Macrodilution Broth Procedures," Ch 101-102 (1985). El extracto usado en el ensayo MIC fue el extracto del Ejemplo No. 1 de la presente memoria. Los ensayos mostraron que el extracto fue eficaz para inhibir el crecimiento de *Candida albicans*.

También se realizó un ensayo MIC para ensayar comparativamente un extracto biológicamente activo de la presente invención y un extracto preparado a partir de nogales cultivados en América. Ambos extractos se prepararon por el procedimiento que implica sólo las etapas uno a cuatro como se ha descrito en el Ejemplo No. 1 de la presente memoria. El extracto biológicamente activo de la presente invención preparado por las etapas uno a cuatro, y repitiendo la etapa tres y etapa cuatro 2 veces, se describe en la presente memoria como "el extracto 4x". El extracto preparado por las etapas uno a cuatro, y repitiendo la etapa tres y etapa cuatro 2 veces de nogales cultivados en América se describe en la presente memoria como "el extracto americano 4x".

Los ensayos comparativos del extracto 4x y del extracto americano 4x mostraron que el extracto 4x de la presente invención fue eficaz para inhibir el crecimiento de *Candida albicans*, mientras que el extracto americano 4x fue incapaz de inhibir el crecimiento de *Candida albicans*.

El procedimiento siguiente se usó para evaluar la actividad anti-cancerosa del extracto biológicamente activo del Ejemplo No. 1 frente a células de cáncer de mama.

25 Ejemplo referencia No. 5

La evaluación implicó el uso del extracto biológicamente activo del Ejemplo No. 1 en varias formas diluidas con agua para variar la concentración del extracto. El extracto biológicamente activo tuvo un efecto citotóxico en las células de cáncer de mama a todas las concentraciones ensayadas

Una placa de 96 pocillos se sembró con células de adenocarcinoma de mama de tipo MCF-7 a una concentración de 5×10^4 /ml en medio de cultivo en una cantidad de 200 μ l por pocillo. El medio de cultivo comprendió EME, 5% suero fetal bovino, 75 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 μ g/ml de insulina de páncreas bovino, 1 mM de penicilina, 1 mM de estreptomina y 1 mM de piruvato de sodio. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C en un incubador con dióxido de carbono ajustado a 5%. El extracto biológicamente activo del Ejemplo No. 1 se diluyó con agua, según fue necesario, en cantidades suficientes para proporcionar las diluciones siguientes 1/10, 1/15, 1/20, 1/40, 1/80, y 1/160. Las diluciones del extracto biológicamente activo se añadieron a las células de cáncer de mama que se incubaron durante 48 horas en las condiciones descritas anteriormente. Los pocillos que contenían sólo medio de cultivo y células de cáncer de mama y los pocillos que contenían sólo medio de cultivo, células de cáncer de mama y agua se usaron como controles.

ES 2 401 390 T3

- 5 El medio de cultivo se aspiró y los pocillos se lavaron una vez con 200 μ l de DPBS, que se eliminó. Se añadieron doscientos μ l de medio de cultivo que contenía 0,863 mg/ml de MTT a cada pocillo. Las células se incubaron adicionalmente durante cuatro horas en las condiciones descritas anteriormente, después de lo cual el medio de cultivo se aspiró y se solubilizó en 200 μ l de DMSO. La supervivencia celular se determinó midiendo la densidad óptica de las células en cada pocillo con un lector de placas de microtitulación ajustado a 560 nm. La Tabla 2 siguiente identifica la concentración de células cancerosas que permanece después del tratamiento con cada dilución del extracto biológicamente activo del Ejemplo No. 1.

Tabla 2

Dilución del Extracto/ Tipo de Control	Ensayo 1 (DO)	Ensayo 2 (DO)	Valor medio del ensayo (DO)	Ruido de Fondo	% de Citotoxicidad (Valor medio)
Blanco	0,045	0,048	0,047	0	0
Agua	0,154	0,164	0,159	0,112	0
Dil. 1/10 del Extracto	0,044	0,048	0,046	-0,001	71,70
Dil. 1/15 del Extracto	0,048	0,047	0,048	0,001	69,18
Dil. 1/20 del Extracto	0,059	0,054	0,057	0,009	58,49
Dil. 1/40 del Extracto	0,068	0,066	0,067	0,020	45,28
Dil. 1/80 del Extracto	0,104	0,122	0,113	0,066	-25,79
Dil. 1/160 del Extracto	0,145	0,192	0,169	0,122	-83,02

- 10 La Tabla 2 muestra que las diluciones 1/10, 1/15, 1/20, y 1/40 del extracto biológicamente activo tuvieron un efecto citotóxico en las células de cáncer de mama y que las diluciones 1/80 y 1/160 del extracto biológicamente activo no tuvieron un efecto citotóxico en las células de cáncer de mama.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para preparar una fracción anti-microbiana a partir de una raíz o corteza de una variedad de la especie de nogal *J. regia* L. comprendiendo dicho proceso tratar la raíz o corteza con un disolvente acuoso durante un periodo de tiempo suficiente para extraer de la raíz o corteza una disolución acuosa que contiene en forma disuelta un cantidad deseada de un extracto biológicamente activo, en el que el disolvente acuoso comprende al menos aproximadamente 70% de agua; separar por cromatografía líquida una fracción anti-microbiana del extracto biológicamente activo ; y recuperar la fracción anti-microbiana de éste.
2. Un proceso según la reivindicación 1, en el que la disolución contiene al menos aproximadamente 20% en peso de extracto.
- 10 3. Un proceso según la reivindicación 1, en el que el disolvente comprende aproximadamente 100% en peso de agua.
4. Un proceso según la reivindicación 1, en el que el disolvente comprende al menos aproximadamente 90% en peso de agua.
- 15 5. Un proceso según la reivindicación 4, en el que el disolvente comprende aproximadamente 90% en peso de agua y aproximadamente 10% en peso de alcohol.
6. Un proceso según la reivindicación 5, en el que el alcohol es etanol.
7. Un proceso según la reivindicación 5, en el que el disolvente comprende aproximadamente 70% en peso de agua y aproximadamente 30% en peso de alcohol.
8. Un proceso según la reivindicación 7, en el que el alcohol es etanol.
- 20 9. Un proceso según la reivindicación 1, en el que las condiciones de extracción incluyen tratar la parte con el disolvente a una temperatura de disolvente de 4°C a 20°C durante un periodo de tiempo suficiente para extraer de la parte una disolución que contiene en forma disuelta al menos aproximadamente 20% en peso del extracto.
10. Un proceso según la reivindicación 9, en el que la temperatura del disolvente es aproximadamente 4°C y la disolución contiene aproximadamente 20% en peso del extracto.
- 25 11. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la variedad es nogal marroquí.

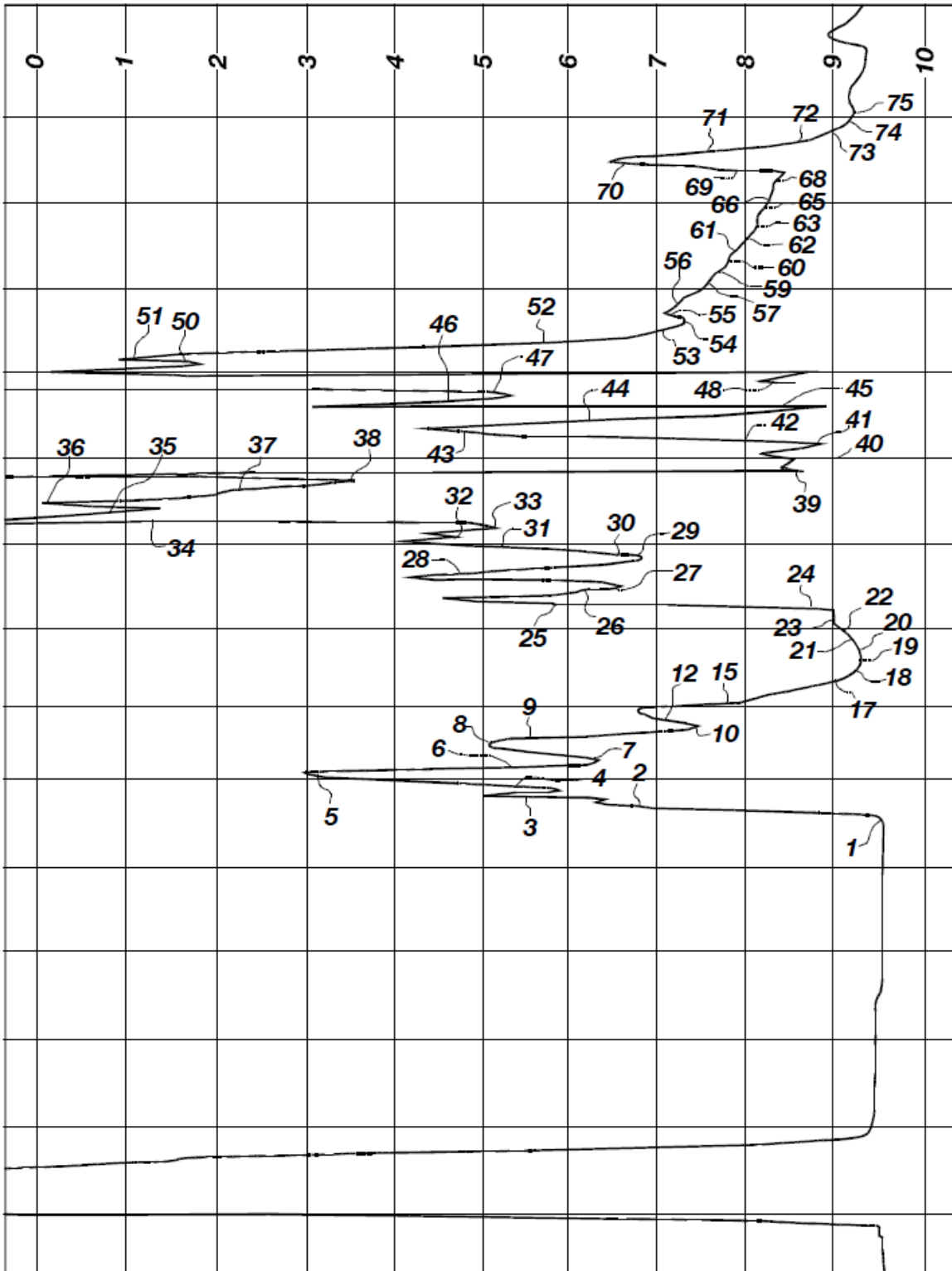


FIG. 1

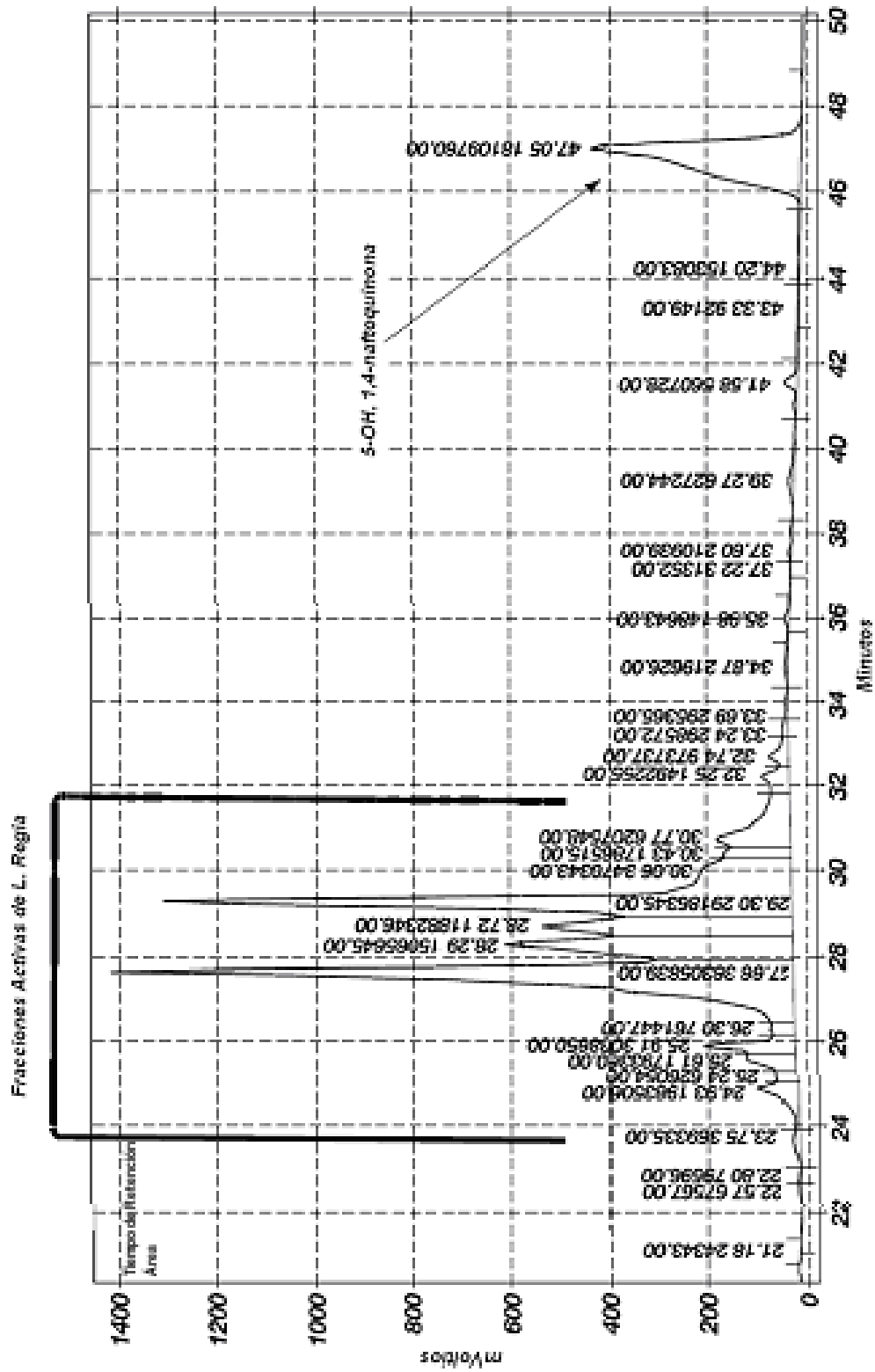


FIG. 2

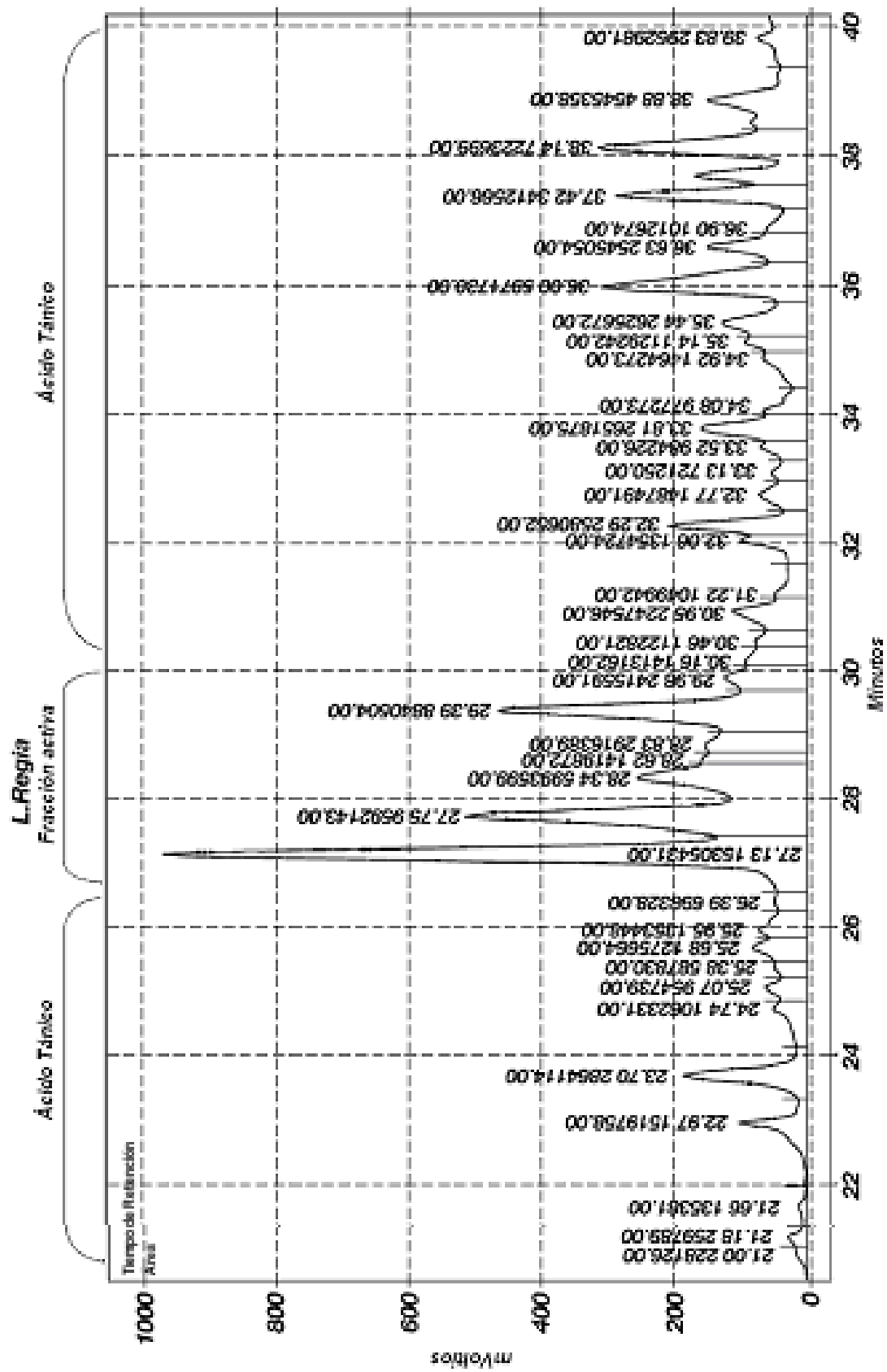


FIG. 3

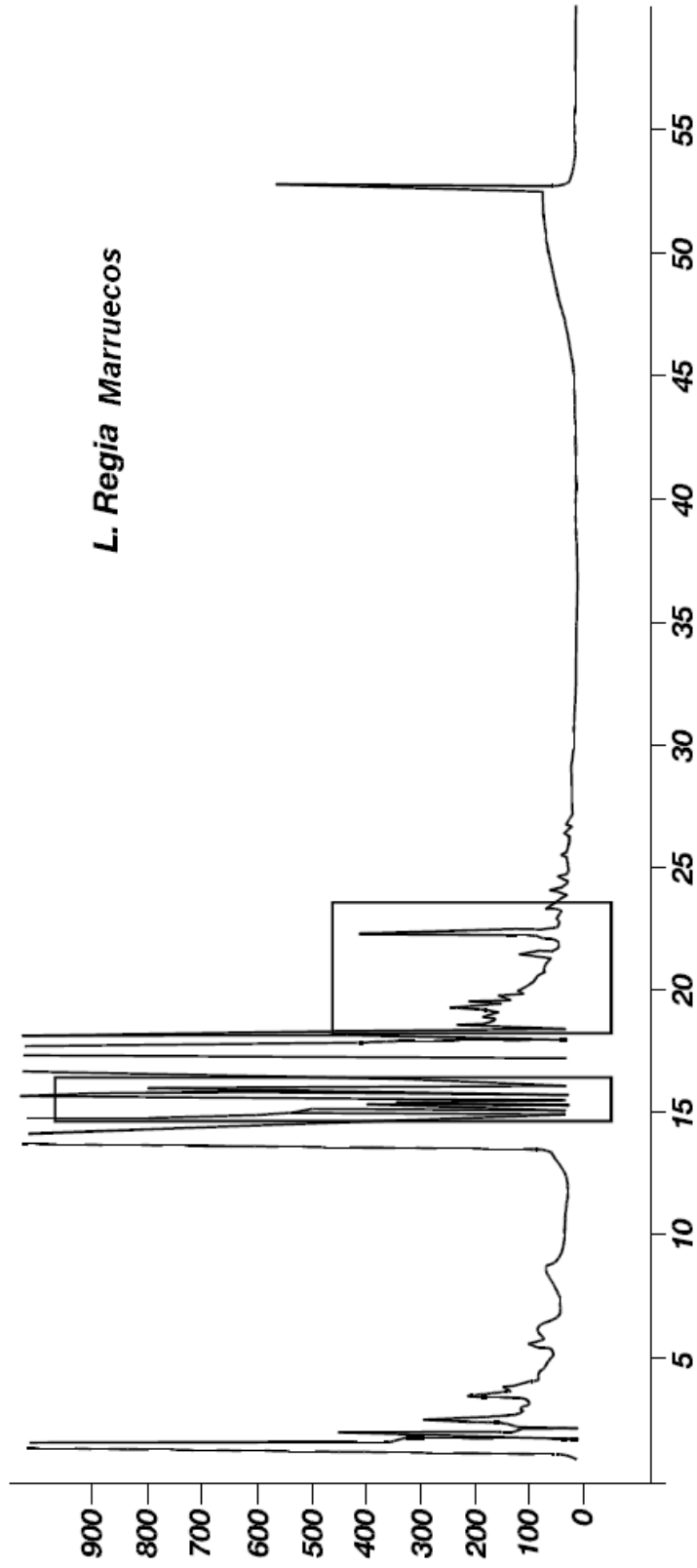


FIG. 4

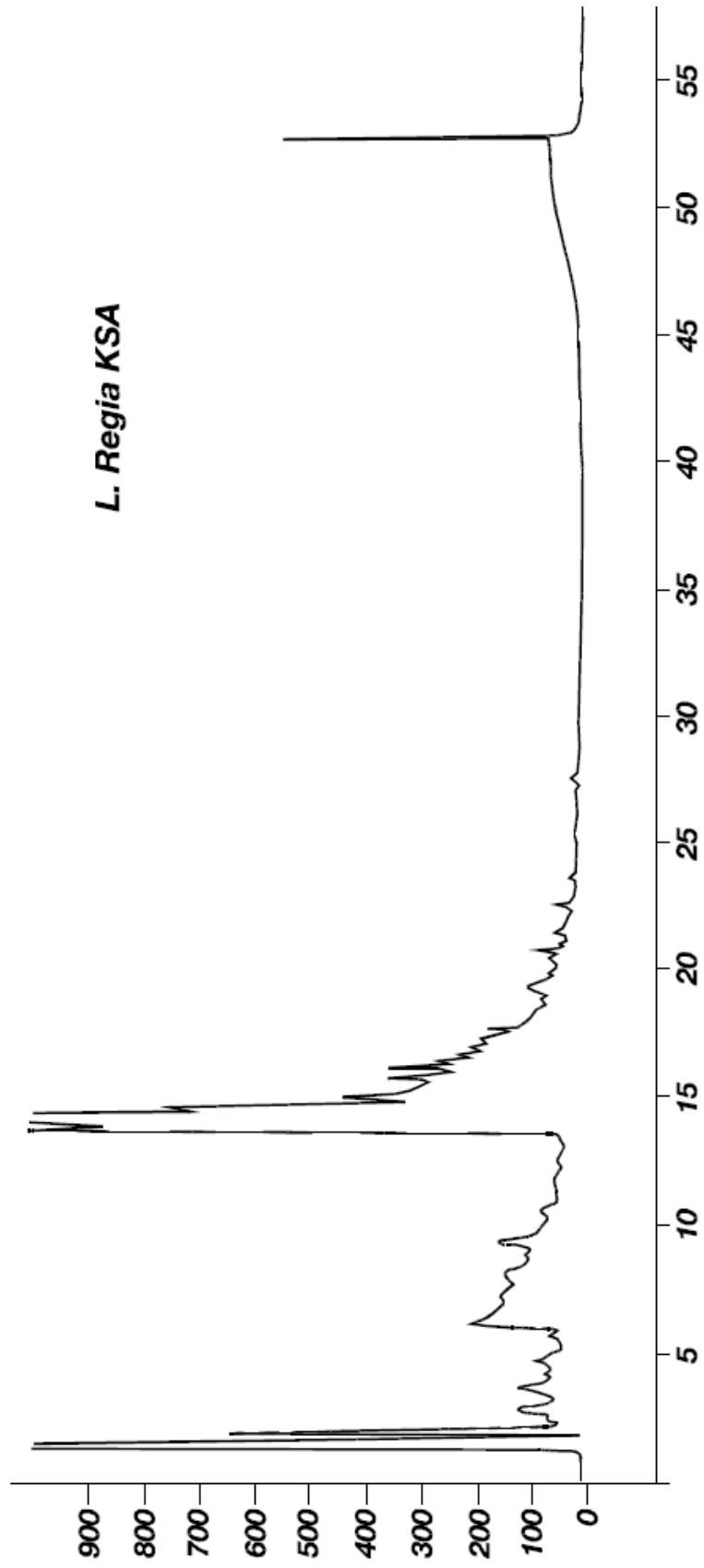


FIG. 5