

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 574**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/63** (2006.01)

**A61K 36/33** (2006.01)

**A61P 9/14** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2010 E 10760244 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 2473178**

54 Título: **Composición para el tratamiento de las hemorroides y enfermedades relacionadas**

30 Prioridad:

**02.09.2009 IT MI20091523**

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

**19.02.2014**

73 Titular/es:

**BIONAP S.R.L. (100.0%)  
Via Badalà 6  
95010 S. Venerina (CT), IT**

72 Inventor/es:

**RIZZA, LUISA;  
MUNAFO', SALVATORE y  
SERRAINO, ALBERTO**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 443 574 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**

Composición para el tratamiento de las hemorroides y enfermedades relacionadas

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a nuevas composiciones de producto farmacéutico, nutracéutico, alimentos saludables y dispositivo médico para la prevención o el tratamiento de las hemorroides.

10 Más particularmente, la presente invención se dirige a composiciones para uso oral o aplicación tópica que comprenden polisacáridos del extracto de cladodios de nopal en combinación con extractos de la hoja de olivo (corticoides de *Olea europaea*) y opcionalmente con anestésicos locales, vasoconstrictores, sustancias astringentes y/o con extractos vegetales que tienen efecto antioxidante o antiinflamatorio así como aquellos de botones de alcaparro, antocianósidos de naranjas rojas, arroz negro o de otras fuentes naturales y sus combinaciones, útiles para la prevención y terapia de la enfermedad hemorroidal.

**15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

20 Las hemorroides son estructuras anatómicas angio-cavernosas del canal anal presentes en útero en la vida adulta que completa la continencia de líquido y gas a través del aflujo y flujo descendente sanguíneo, que expande su volumen (lo que cierra el lumen del canal anal) debido al aflujo arterial, y que reduce su volumen (lo que reabre el lumen del canal anal) debido al flujo descendente venoso.

25 La enfermedad hemorroidal consiste en el deslizamiento parcial del recubrimiento del canal anal: la mucosa rectal se desliza empujando las hemorroides superficiales internas que, en consecuencia, empujan las hemorroides superficiales externas.

30 Las hemorroides pueden tener etiopatogénesis hereditaria o constitucional: sin embargo, la causa que subyace su desarrollo no está aún clara. Probablemente, considerando la recurrencia de la enfermedad en varios miembros familiares, a veces están involucrados factores genéticos. El estreñimiento puede agravar las hemorroides, debido al efecto irritante que las heces duras y los fuertes esfuerzos de defecación pueden tener en el canal anal.

35 Durante el embarazo, algunos de los cambios importantes en el cuerpo femenino promueven las hemorroides y venas varicosas entrantes o empeorando en las extremidades inferiores: durante el embarazo, de hecho, el peso del cuerpo femenino aumenta con efectos negativos en el complejo venoso (durante el embarazo, de hecho, el volumen del útero aumenta empujando el abdomen, entorpeciendo el reflujo sanguíneo).

El estreñimiento (que puede comenzar o empeorar durante el embarazo) causa frecuentemente la aparición de la enfermedad hemorroidal durante el embarazo.

40 En personas que padecen de estreñimiento, las hemorroides están frecuentemente relacionadas con fisuras anales, desgarramientos o úlceras que se producen al final del canal anal debido al gran esfuerzo de defecación que puede determinar daño en el tejido en esta región.

45 La enfermedad hemorroidal está muy extendida, afecta tanto en América del Norte como en Europa a 1 de cada 10 millones de personas (Holzheimer RG, Eur J Med Res, 26 enero 2004; 9 (1): 18-36, Hemorrhoidectomy: indications and risks). La enfermedad hemorroidal se trata usualmente con reglas dietéticas y de conducta estrictas y con tratamientos farmacológicos. La mayoría de las personas que padecen de la enfermedad hemorroidal son capaces de vivir con esta enfermedad gracias a estrictos hábitos dietéticos y estilo de vida, higiene y/o el uso de aplicación tópica de productos que contienen esteroides (debido a su acción antiinflamatoria) y anestésicos locales.

50 Si es necesario, se pueden añadir reglas dietéticas y de comportamiento con un tratamiento farmacológico con aplicación tópica de productos (cremas, pomadas, ungüentos, espumas y supositorios) que contienen esteroides, que actúan en el dolor y la inflamación, y/o anestésicos locales, que alivian la picazón y el dolor. Sin embargo, estos productos se recomiendan para terapias a corto plazo, porque el tratamiento a largo plazo con estas sustancias puede determinar irritación en el sitio de aplicación, particularmente a nivel de la mucosa rectal y anal.

60 Cuando la dieta saludable y balanceada con ayuda de un tratamiento con fármacos adecuados no es efectiva y surgen complicaciones de la patología, se usa el tratamiento quirúrgico (hemorroidectomía, hemorroidopexia o prolapsoctomía), pero esto puede estar seguido de complicaciones postquirúrgicas así como sangrado, fisuras, fístulas, abscesos, infecciones perianales, retención urinaria, incontinencia fecal y urinaria.

Dada la prevalencia de la enfermedad hemorroidal, especialmente en mujeres embarazadas y en el posparto temprano, y considerando la extensión de sus complicaciones y patologías relacionadas, es aún relevante el hallazgo de un tratamiento seguro y efectivo para la prevención y la terapia de tales enfermedades, evitando al paciente, al mismo tiempo, experimentar tratamientos farmacológicos y quirúrgicos repetitivos con el fin de solucionar la enfermedad y síntomas relacionados.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Ahora se identifican nuevas composiciones de producto farmacéutico, dermocosmético, nutracéutico, alimentos saludables y dispositivos médicos capaces de reducir el componente inflamatorio característico de la enfermedad hemorroidal y sus complicaciones. Estas composiciones tienen también un efecto mucoprotector y por tanto son incluso capaces de proteger la mucosa anal y rectal del efecto irritante de sustancias que pueden estar presentes en las heces causando dolor en la fase aguda de la enfermedad facilitando o acelerando su recaída.

Estas composiciones se caracterizan por contener polisacáridos del extracto de cladodios de Nopal en combinación con el extracto de hoja de olivo que tiene acción antioxidante y/o antiinflamatoria, y opcionalmente con extractos de botones de Alcaparro, antocianósidos de naranjas rojas, arroz negro o de otras fuentes naturales y sus combinaciones, para prevenir y tratar la enfermedad hemorroidal.

Como se usa en la presente, el término "*dispositivo médico*" se refiere a un "dispositivo médico activo" (clase I) de acuerdo con la clasificación de la Directiva 93/42/EEC Anexo IX.

Nopal (Nopal) es una planta perteneciente a las cactáceas, nativa de México y al sur-oeste de Estados Unidos, pero generalizada incluso en la vegetación mediterránea de autosiembra.

Los frutos y cladodios jóvenes (tiernos) se usan desde la antigüedad para uso dietético o para preparar bebidas alcohólicas.

En la medicina popular la planta se usa de muchas maneras: se cree que los frutos son astringentes y fueron usados por marineros, debido a su abundancia de vitamina C, para prevenir el escorbuto; los cladodios jóvenes se usan como cataplasma - calentados al horno - como agentes emolientes; el uso de pulpa de cladodios en heridas cutáneas y úlceras es un excelente remedio curativo, antiinflamatorio y reepitelizante: este es un viejo remedio tradicional siciliano usado aún hoy en día en la tradición del país; la decocción de flores tiene propiedades diuréticas.

Más recientemente se observó que: 1) los frutos de nopal tienen marcadas propiedades antioxidantes (Tesoriere y otros, Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C, *Am J Clin Nutr.* 2004 agosto; 80(2): 391-395); 2) un extracto de nopal es efectivo en la terapia de la resaca de alcohol (Wiese J y otros, Effect of *Opuntia ficus indica* on symptoms of the alcohol hangover, *Arch Intern Med.* 2004 junio 28; 164(12): 1334-1340); 3) la alta concentración de la fracción polisacárida en cladodios de nopal, formados prácticamente por un polímero de galactosa, arabinosa y otros azúcares, tiene propiedades de ligando graso y azúcar masticables (haciéndolos así imposibles de absorber) conduciendo a buenos resultados en los metabolismos glico-lipídicos y en el síndrome metabólico; 4) mucilagos y pectinas de los cladodios de nopal demostraron ser gastroprotectores en modelos animales experimentales (Vazquez-Ramirez R. y otros, Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus indica* mucilage, *World J. Gastroenterol.* 2006 julio 21; 12(27): 4318-4324).

Trombetta y otros, (Trombetta D. y otros, Effects of polysaccharides from *Opuntia ficus indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat, *Phytomedicine*, 13 (2006) 352-358) observaron que los polisacáridos del extracto de cladodios de nopal tienen efecto curativo cutáneo actuando sobre la matriz celular y modulando la deposición de laminina.

Se encontró ahora inesperadamente que los polisacáridos extraídos de cladodios de nopal producen un efecto antiinflamatorio en una forma sinérgica con el extracto de hoja de olivo y que su efecto se incrementa por la adición de extractos de botones de alcaparro, antocianósidos de naranjas rojas, arroz negro o de otras fuentes naturales y sus combinaciones, por lo cual los extractos de nopal y olivo se usan convenientemente en combinación para prevenir y tratar la enfermedad hemorroidal.

De acuerdo con la invención, se proporciona el extracto de cladodios de nopal que contiene una fracción de polisacáridos que tienen un  $PM > 10^4$  Da y extracto de hojas de olivo en la forma de una preparación combinada para uso simultáneo o separado en la prevención y tratamiento de la enfermedad hemorroidal, y particularmente para usar en la mucoprotección de la mucosa anal y rectal y prevenir o tratar inflamación de la misma.

De acuerdo con la presente invención, los polisacáridos de cladodios de nopal pueden estar en forma de mucílago, obtenido por proceso de prensado o por tratamiento en agua a temperatura ambiente. Alternativamente, después del proceso de prensado, el zumo de cladodios se centrifuga y el sobrenadante se somete a ultrafiltración lo que conduce a una solución acuosa enriquecida en fracción de polisacáridos de  $PM > 10^4$  Da que puede concentrarse y después secarse. El contenido de polisacáridos en el extracto de cladodios de nopal es de 1 a 70%.

La hoja de olivo puede extraerse con solventes acuosos o hidroalcohólicos (10-80% etanol), a temperatura ambiente o a 60-70°C. La extracción hidroalcohólica puede ser repetitiva con el fin de obtener una concentración más alta de biofenoles. Al final del proceso de extracción, el solvente acuoso se elimina en vacío a 40°C.

Además, se puede obtener una concentración más alta de biofenoles cargando el extracto seco en resinas, preferiblemente resinas estirénicas, y eluyendo con etanol:agua 50:50 (v/v).

El extracto de hoja de olivo contiene fenoles (tirosol, hidroxitirosol y sus derivados), ácidos cinámicos, flavonoides (así como apigenina, luteolina y sus derivados glucosídicos, rutina, quercetina), lignanos, secoiridoides (así como oleurosidos, oleuropeína y sus derivados, ácido elenólico), y se caracteriza por un contenido particular en polifenoles: flavonoides (apigenina, luteolina y sus derivados) 2-40% (p/p), oleuropeína 0.5-10% (p/p) e hidroxitirosol y derivados 1-30% (p/p).

La presente invención se refiere además a composiciones de producto farmacéutico, dermocosmético, nutracéutico, alimentos saludables y dispositivo médico para administración oral, tópica o aplicación rectal, que comprende polisacáridos que tienen un PM de  $>10^4$  Da de extracto de cladodios de nopal en combinación con extracto de hoja de olivo que tiene acción antioxidante y/o antiinflamatoria, y opcionalmente con extractos de botones de alcaparro, antocianósidos de naranjas rojas, arroz negro o de otras fuentes naturales y sus combinaciones, para prevenir y tratar la enfermedad hemorroidal.

De acuerdo con la presente invención, los términos "combinación" y "preparación combinada" se usan para combinaciones terapéuticas como fijas de los extractos o los activos considerados. En el primer caso (combinación fija) los extractos o los activos están contenidos en la misma composición, con vehículos, excipientes u otros ingredientes útiles para las aplicaciones propuestas; en el segundo caso (combinación terapéutica) los ingredientes activos pueden ser administrados o aplicados en composiciones separadas así como a través de diferentes vías de administración, con el fin de obtener un efecto terapéutico combinado.

El efecto sinérgico debido a la combinación de los activos considerados o extractos permite reducir favorablemente el componente inflamatorio combinado con la enfermedad hemorroidal, y las composiciones consideradas tienen además un efecto mucoprotector, son capaces al mismo tiempo de proteger la mucosa rectal, determinando una resolución rápida de los síntomas con un grado superior de seguridad terapéutica, un factor muy importante en caso de tratamientos repetitivos, generalmente para tratamientos tópicos y particularmente para mujeres embarazadas o de parto y tratamiento de personas de edad avanzada.

Esto permite llevar una terapia inocua dirigida y efectiva, adecuada para prevenir o curar la enfermedad hemorroidal y sus complicaciones - así como fisuras anales - incluso en combinación con otras terapias farmacológicas o quirúrgicas para las mismas enfermedades.

El objeto de la invención es por lo tanto proporcionar composiciones de producto farmacéutico, dermocosméticos, nutracéuticos, alimentos saludables y dispositivo médico orales o tópicos (rectales), que comprenden polisacáridos del extracto de cladodios de nopal en combinación fija o terapéutica con extracto de hoja de olivo y opcionalmente con extractos de botones de alcaparro, antocianósidos de naranjas rojas, arroz negro o de otras fuentes naturales y sus combinaciones, para prevenir y tratar la enfermedad hemorroidal, que incluyen sus complicaciones y dolencias relacionadas (por ejemplo fisuras anales), para la prevención de la recaída en la misma enfermedad y para proteger la mucosa rectal del efecto irritante de algunos componentes alimentarios que pueden estar presentes en las heces.

## DESCRIPCIÓN DE LOS FIGURAS

Las características y ventajas adicionales de la presente invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción de varias modalidades dadas como ejemplos no limitantes con referencia a las figuras, en donde, con respecto a las composiciones reivindicadas:

- La Figura 1 representa un esquema del modelo de mucoadhesión *in vitro*;
- La Figura 2 grafica la comparación de los valores del porcentaje de mucoadhesión (porcentaje de inhibición de la unión de lectina después del tratamiento) para el extracto de cladodios de nopal contra el ácido hialurónico en un modelo de mucoadhesión *in vitro* en células epiteliales de la mucosa rectal;

- La Figura 3 grafica los valores del porcentaje de inhibición del marcador de inflamación ICAM-1 determinado por polisacáridos del extracto de cladodios de nopal y por extractos de hojas de *Olea europaea* en células *Caco2* tratadas con sustancias proinflamatorias;
- La Figura 4 grafica los valores del porcentaje de inhibición del marcador de inflamación IL-8 determinado por polisacáridos del extracto de cladodios de nopal y por extractos de hojas de *Olea europaea* en células *Caco2* tratadas con sustancias proinflamatorias.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones de producto farmacéutico, dermocosméticos, nutracéuticos, alimentos saludables y dispositivo médico para la administración oral o para la aplicación tópica o intrarrectal para tratar la enfermedad hemorroidal y dolencias relacionadas (así como fisuras anales) y para la prevención de la recaída de las mismas patologías, que comprende polisacáridos extraídos de cladodios de nopal, opcionalmente soportados en maltodextrinas hasta 50% (p/p), en terapia de combinación y fija con extracto de hoja de olivo que tiene una acción antioxidante y antiinflamatoria y opcionalmente con extractos de botones de alcaparro, antocianósidos de naranjas rojas, arroz negro o de otras fuentes naturales y sus combinaciones, para prevenir y tratar las mismas enfermedades.

Los activos del extracto de hoja de olivo útiles para las composiciones reivindicadas pueden comprender, como ejemplos no limitantes: fenoles, (así como tirosol, hidroxitirosol y sus derivados), ácido cinámico, flavonoides (así como apigenina, luteolina y sus derivados glucosídicos, rutina, quercitina), lignanos, secoiridoides (así como oleurósido, oleuropeína y sus derivados, ácido elenólico).

Las composiciones reivindicadas pueden ser líquidas, sólidas o semisólidas, capaces de ser administradas *per os* (por ejemplo, soluciones orales, suspensiones orales, emulsiones orales, tabletas, polvos y tabletas para preparar extemporáneamente soluciones orales, suspensiones o emulsiones) o para ser aplicadas tópicamente (por ejemplo, cremas, pomadas, espumas, supositorios, gel, aerosol).

Estas composiciones pueden incluir además conservantes, agentes tampones iónicos y no iónicos y aditivos normalmente usados para preparar composiciones orales o tópicas.

Las composiciones reivindicadas pueden comprender además otros componentes naturales útiles para el tratamiento de las patologías mencionadas tales como anestésicos locales y agentes vasoconstrictores (por ejemplo, flavonoides de extractos de Castaño de Indias, que tiene efecto antiinflamatorio y vasoconstrictor, y escina, el principio activo del Castaño de Indias que tiene acción vasoprotectora, antiedematoso y antioxidante y capaz de estabilizar la resistencia vascular y la permeabilidad, actualmente usada en productos tópicos y sistémicos; extracto de Rusco, rico en sustancias similares a aquellas encontradas en hipocastaño, capaces de determinar una acción venotónica, vasoconstrictora y antiinflamatoria observada en varios estudios clínicos, y extracto de polifenoles y flavonoides de Ciprés, que tiene acción antiinflamatoria y vasoconstrictora). Estas sustancias raramente producen efectos indeseables, a diferencia de los clásicos medicamentos flebotónicos (la principal contraindicación para productos que contienen cortisona son, además del embarazo, las hemorroides sangrantes, especialmente cuando existe sangre goteando: en este caso, la cortisona puede retrasar el proceso curativo y por lo tanto es mejor usar productos libres de cortisona).

El solvente más común para composiciones líquidas, suspensiones o emulsiones es agua o una solución acuosa que contiene componentes útiles para uso oral o tópico.

Las composiciones tópicas pueden contener surfactantes (por ejemplo, monoestearato de glicerilo), sustancias grasas (como base de supositorio), bases para ungüento (por ejemplo, ácido esteárico, alcohol estearílico o lanolina), agentes de suspensión (por ejemplo, talco, anhídrido silícico), conservantes antimicrobianos (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo o p-hidroxibenzoato de butilo), lubricantes (por ejemplo, estearato cálcico estearato magnésico, estearato aluminico, ácido estearilo, ácido esteárico, alcohol cetílico, ácido palmítico, almidón o PEG) y sustancias que tienen una acción antiséptico suave (por ejemplo extracto de lavanda o extracto de romero) y sus combinaciones.

#### Polisacáridos de extracto de cladodios de Nopal

La estructura química y composiciones de mucílago de cladodios de *Opuntia Ficus Indica* se analizó por muchos grupos de investigadores (D. McGarvie, H. Parolis, Methylation analysis of the mucilage of *Opuntia ficus indica*. Carbohydrate Research, (1981) 88: 305-314; M. S. Karawya y otros. Mucilages and Pectines of *Opuntia*, *Tamarindus* and *Cydonia*. Planta Medica (1980) Suplemento: 68-75; M. E. Malainine y otros. Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus indica*. Cellulose extraction and characterisation. Carbohydrate polymers (2003) 51: 77-83).

Se considera que el mucílago se compone de ácido 1,4- $\alpha$ -D -galactopiranosilurónico y residuos de 1,2- $\beta$ -L - ramnopiranosilo a los que están unidas cadenas cortas de residuos de 1,6- $\beta$ -D -galacto-piranosilo en la posición 4 de todos residuos de ramnopiranosilo. La mayoría de los residuos galactosilo están ramificados en O-3, o en O-4, los que portan principalmente residuos arabinofuranosilo y xilopiranosilo.

5

(D. McGarvie, H. Parolis, Methylation analysis of the mucilage of *Opuntia ficus indica*. Carbohydrate Research, (1981) 88: 305-314).

10 El mucílago de extracto de cladodios de nopal se separa por un proceso de compresión simple (D. Trombetta y otros Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. Phytomedicine (2006) 13: 352-358) o por el tratamiento con agua (R. Vázquez-Ramirez y otros Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. World J Gastroenterol (2006) 12(27):4318-4324).

#### 15 Proceso de extracción de cladodios de Nopal

Los cladodios de nopal se lavaron y se cortaron en pedazos de aproximadamente 10 cm<sup>2</sup> y después se comprimieron mediante el uso de una prensa de forjado hidráulico.

20 El zumo obtenido por la compresión de los cladodios se centrifuga durante 15 min a 5000 g y el sobrenadante se somete a ultrafiltración. De esta manera, se obtiene una solución acuosa enriquecida en la fracción de polisacáridos con PM > 10<sup>4</sup> Da. Esta solución acuosa se concentra después a baja presión y a 35-40°C, y posteriormente se seca mediante secado por pulverización o secado por congelación.

25 El análisis de la fracción de polisacáridos del extracto de cladodios de nopal confirmó la presencia de arabinosa, ramnosa, xilosa, galactosa y ácido galacturónico (D. McGarvie, H. Parolis, Methylation analysis of the mucilage of *Opuntia ficus indica*. Carbohydrate Research, (1981) 88: 305-314). La NMR (resonancia magnética nuclear) señaló una estructura típica en polisacáridos de cladodios de Nopal. El contenido de polisacáridos en el extracto de cladodios de nopal es de 1 a 70% p/p.

#### 30 Extracto de hoja de olivo

El extracto de hoja de olivo tiene una composición característica en biofenoles, que contiene fenoles simples (tirosoles, hidroxitirosoles y derivados), flavonoides (apigenina, luteolina y sus glucósidos) y secoridooides (oleuropeína y derivados).

35 Los biofenoles se extraen de la hoja de olivo usando solventes acuosos o hidroalcohólicos que contienen etanol de 10 a 80% v/v (Lee O.H. y otros Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaf and their antioxidant activities Bioresour Technol (2009) Publicación electrónica antes de impresión; Mylonaki S. y otros, Optimisation of the extraction of olive (*olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. Anal Bioanal Chem. (2008) 392(5):977-85). Los procesos de extracción se llevan a cabo generalmente a temperatura ambiente para evitar la degradación o cambios en las sustancias activas, pero en algunos casos los procesos de extracción pueden llevarse a cabo a temperatura de hasta 60-70°C. La extracción de biofenoles a partir de la matriz de la planta puede llevarse a cabo incluso usando microondas (Japón-Lujan R, Luque de Castro MD. Small branches of olive tree: a source of biophenols complementary to olive leaf. J Agric Food Chem. (2007) 30; 55(11):4584-8), ultrasonido (Vassiliki T Papoti, Maria Z. Tsimidou. Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (*Olea europaea* L.) leaf. J Agric Food Chem 2009, 57, 3470-3477), o extracción líquida supercaliente (Japón-Luján R, Luque de Castro MD. Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaf. J Chromatogr A. (2006) 1136(2):185-91), reduciendo en gran medida el tiempo de contacto de la matriz de la planta y el solvente (de 3 horas a 10 minutos).

#### 50 Extracción de biofenoles a partir de la hoja de olivo

La hoja de olivo se seca, se corta y después se extrae con una solución de etanol/agua 50:50 (v/v) a temperatura ambiente durante 12 horas. El proceso de extracción se lleva a cabo con una relación fármaco:solvente de 1:5 (g/ml). Cuando se completa la extracción, se elimina el extracto de la hoja y se someten a un segundo proceso de extracción hidroalcohólico en las mismas condiciones. Los extractos se mezclan después y se elimina el solvente por concentración al vacío a 40°C. Finalmente, para aumentar la concentración de biofenoles, el extracto se adsorbe en resinas de estireno y biofenoles y después se eluye con una solución de etanol/agua 50:50 (v/v).

El extracto obtenido contiene: flavonoides (apigenina, luteolina y sus derivados) 2-40%, oleuropeína 0.5-10% e hidroxitirosoles y derivados de 1-30%.

60

Los métodos para obtener las composiciones farmacéuticas o nutracéuticas reivindicadas son conocidos en la técnica. Los polisacáridos extraídos del nopal pueden estar presentes de 0.5 a 50% de las composiciones totales, mientras que las otras sustancias activas pueden estar presentes de 1 a 30% (p/p o p/v).

5 Las sustancias reivindicadas se aplican individualmente en el campo dietético, de modo que son seguras aún para categorías de pacientes delicados, así como personas ancianas, niños o mujeres embarazadas.

10 Las composiciones reivindicadas pueden contener sustancias de origen natural con acción astringente (así como extracto de hamamelis, óxido de zinc o calamina), agentes vasoconstrictores (por ejemplo, fenilefrina HCl, sulfato de efedrina, epinefrina y epinefrina HCl), antiinflamatorios esteroideos (por ejemplo, hidrocortisona), fitoesteroides (por ejemplo, flavio lignanos, enterolignanos, coumestrol, equol, beta-sitosterol, ginsenoides), anestésicos locales (por ejemplo, benzocaína 5 - 20%, alcohol bencílico 1 - 4%, dibucaína 0.25 - 1%, lidocaína 0.5 - 5%, pramoxina aproximadamente 1%, tetracaína 0.5 - 1%) y otras combinaciones. Preferiblemente, los componentes mencionados se usan en su forma hidrosoluble (por ejemplo, ésteres o sales).

15 La presente invención comprende el uso de las composiciones descritas para tratar y prevenir la recaída de la enfermedad hemorroidal administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones como se definió anteriormente, opcionalmente en combinación con extractos de botones de alcaparro, antocianósidos de naranjas rojas, arroz negro o de otras fuentes naturales y sus combinaciones, para prevenir y tratar las mismas enfermedades.

20 Los ejemplos no limitantes de composiciones de acuerdo con la invención se presentan en las siguientes tablas.

**Ejemplo 1: Composiciones**

25 1. Cápsulas duras:

Componentes	mg/cápsula
Extracto de cladodios de nopal	200-400 mg
Extracto de hoja de olivo	200-400 mg
Lactosa	Hasta rellenar la cápsula

2. Geles:

30

Componentes	% p/p
Natrosol (hidroxietilcelulosa)	1.75
Extracto de cladodios de nopal	0.5 - 10
Extracto de hoja de olivo	0.5 - 10
Propilenglicol	10.00
Citrato sódico	0.30
Metabisulfito sódico	0.50
Edetato disódico	0.10
p-Hidroxibenzoato de metilo	0.20
p-Hidroxibenzoato de propilo	0.05
Agua destilada	Hasta 100 gr

3. Supositorios:

Componentes	mg/supositorio
-------------	----------------

Componentes	mg/supositorio
Extracto de cladodios de nopal	200-400 mg
Extracto de hoja de olivo	200-400 mg
BHA	0.15 mg
BHT	0.15 mg
Witepsol S 55	Hasta rellenar

## 4. Ungüentos:

Componentes	% p/p
Extracto de cladodios de nopal	100 -200 mg
Extracto de hoja de olivo	100-200 mg
Macrogol 400	55 g
Macrogol 4000	39.9 g
Agua destilada	Hasta 100 g

5 **Ejemplo 2: Determinación *in vitro* de la mucoadhesión de polisacáridos de cladodios de nopal**

Con el fin de evaluar la capacidad mucoadhesiva de los polisacáridos de cladodios de nopal el ensayo de mucoadhesión *in vitro* descrito por Patel (Patel D. y otros, An in vitro mucosal model predictive of bioadhesive agents in the oral cavity. J Control Release, 1999, 61 (1-2): 175-183) se usó en las células epiteliales intestinales Caco2 suspendidas. En esta prueba la mucoadhesión (capacidad de adhesión de las sustancias probadas en términos de unión a las células mucosales) se determina como una función la inhibición de unión lectina-glicoproteína de membrana determinada por el solapamiento superficial celular debido a la sustancia mucoadhesiva.

**Materials y Métodos**

El tratamiento de células de la mucosa con lectina biotinilada y estreptavidina peroxidasa, determina un color amarillo de la muestra; un pretratamiento de células de la mucosa con una sustancia mucoadhesiva, (30°C, por 15 minutos antes del tratamiento con lectina), se oculta el sitio de unión de la lectina, y reduce la intensidad final de coloración amarilla.

La lectina es una proteína contenida en algunas plantas de Leguminosa (*Canavalia ensiformis*), con alta tendencia de unir residuos glucosídicos y manosídicos de glicoproteínas de membrana; la biotina (vitamina H) se une a la lectina siguiendo su unión a estreptavidina peroxidasa que se añade a la suspensión celular para obtener el complejo proteína-glucosa-lectina-biotina-estreptavidina peroxidasa.

Por adición de diclorhidrato de o-fenilendiamina (o-pd) y peróxido de hidrógeno a la suspensión celular, o-pd se oxida por el complejo proteína-glucosa-lectina-biotina-estreptavidina peroxidasa a 2,3-diaminofenazina, y la muestra se torna amarilla (Fig. 2).

La reacción se bloquea entonces después de 1 min añadiendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. La intensidad de color se lee en el espectrofluorímetro y está proporcionalmente relacionada con la unión entre lectina y residuos glicosídicos en la membrana celular.

Las células Caco2 se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM) con 10% de suero fetal de ternero, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina a 37°C y condiciones 95:5% aire:CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada 2-3 días. Veinte horas antes del tratamiento, las células se tripsinizaron, y se contaron usando un hemacitómetro, se centrifugaron a 1500 rpm/5 min y se resuspendieron en 2 ml de TBS (solución salina tamponada) 0,05 M (pH 4).



Los polisacáridos de cladodios de nopal y el ácido hialurónico (usado como sustancia de referencia debido a sus propiedades mucoadhesivas) se solubilizaron en solución de NaCl 0.9% a 0.5% p/v y estas soluciones se usaron después para el pretratamiento de la prueba en células Caco2. Los resultados se expresaron en porcentaje de sustancia probada y unión de células de la mucosa, inversamente proporcional al porcentaje de reducción del color de la muestra en comparación al control.

El experimento completo se repitió 5 veces. El análisis estadístico de los resultados se ejecutó por medio de ANOVA unidireccional seguido de la prueba post hoc Bonferroni.

## **Resultados**

Como se representa en la Figura 3, los resultados obtenidos con el ensayo *in vitro* de mucoadhesión en células Caco2 suspendidas muestran un porcentaje de mucoadhesión de polisacáridos de Nopal de 48%, significativamente superior al observado con hialuronato de sodio (mucoadhesión de 29%).

## **Conclusiones**

Los resultados del ensayo *in vitro* de mucoadhesión muestran que los polisacáridos de cladodios de nopal tienen un fuerte carácter mucoadhesivo en células Caco2. Este efecto determina, después de la administración oral o la aplicación tópica rectal, la formación de una capa capaz de proteger la mucosa intestinal y rectal del efecto irritante de algunas sustancias que, introducidas con alimentos, pueden estar presentes en las heces. Este efecto es útil para la reducción de los síntomas de la enfermedad hemorroidal y prevención de la recaída.

### **Ejemplo 3: Evaluación *in vitro* de la actividad antiinflamatoria de polisacáridos de cladodios de nopal y extracto de hoja de olivo.**

Con el fin de evaluar la actividad antiinflamatoria de los polisacáridos de cladodios de nopal y extracto de hoja de olivo, se usó una prueba *in vitro* en células Caco2.

Las células intestinales Caco2 - que son ampliamente usadas para estudiar la funcionalidad del tracto gastrointestinal (Sambuy Y. y otros, The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics, Cell Biol Toxicol. 2005; 21(1):1-26; Navarro-Perán E. y otros, The anti-inflammatory and anti-cancer properties of epigallocatechin-3-gallate are mediated by folate cycle disruption, adenosine release and NF-kappaB suppression, Inflamm Res. 2008 Oct 2) - fueron seleccionadas por sus características morfológicas y bioquímicas, típicas del enterocito intestinal.

Las células Caco2 se estimularon con sustancias proinflamatorias. Después se determinó la capacidad de los polisacáridos de cladodios de nopal y del extracto de hoja de olivo para reducir la inflamación en el epitelio intestinal en términos de producción de marcadores de inflamación la molécula ICAM-1 de adhesión intercelular y la interleucina-8 (IL-8). ICAM-1 es un factor importante involucrado en la retención de células T en el epitelio inflamado y representa una señal coestimulante significativa para T CD4 y CD8 (Ramakers JD y otros, Arachidonic acid but not eicosapentaenoic acid (EPA) and oleic acid activates NF-kappaB and elevates ICAM-1 expression in Caco-2 cells. Lipids 2007; 42(8):687-98).

La IL-8 se produce por monocitos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales durante trastornos de inflamación y es muy importante para el reclutamiento de linfocitos T y neutrófilos (Vavricka SR y otros, hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells, Gastroenterology 2004;127(5):1401-9).

La inflamación del epitelio intestinal se indujo mediante interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), dos de las sustancias más poderosas proinflamatorias (Garat C. y otros, Intracellular IL-1Ra type 1 inhibits IL-1-induced IL-6 and IL-8 production in Caco-2 intestinal epithelial cells through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. Cytokine. 2003 jul;23(1-2):31-40).

## **Materials y Métodos**

Los polisacáridos de cladodios de nopal y de extracto de hoja de olivo se diluyeron a 100 mg/ml. De esta solución, se obtuvieron diluciones posteriores para los tratamientos de cultivo de células.

Las células se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM) con suero fetal bovino al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina a 37°C y 95:5% aire: condiciones de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada 2-3 días. Veinticuatro horas

antes del tratamiento, las células se tripsinizaron, se contaron usando un hemacitómetro, y después se sembraron en placas de 96 pocillos (para la prueba ELISA) y placas Petri de 100 mm (para la transferencia a membrana).

Posteriormente, las células se trataron con una mezcla de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) e IFN- $\gamma$  (200 U/ml), y con polisacáridos de cladodios de Nopal y/o con el extracto de hoja de olivo a 200  $\mu$ g/ml durante 48 horas.

Los niveles de expresión de ICAM-1 se determinaron por transferencia a membrana, mientras que la IL-8 se determinó por la prueba ELISA. Los resultados se expresaron como porcentajes de inhibición de marcadores de inflamación en células tratadas con polisacáridos de cladodios de nopal y/o con extracto de hoja de olivo contra células tratadas con IL-1 $\beta$  y IFN- $\gamma$ .

#### - Transferencia a membrana

Las proteínas se extrajeron de células 48 horas después del tratamiento se cargaron en un gel de poliacrilamina 4-12%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con un anticuerpo monoclonal para ICAM-1. La expresión proteica se cuantificó mediante análisis densitométrico de autoradiografías y los valores se expresaron como unidades densitométricas arbitrarias que corresponden a la señal de intensidad.

El resultado se normalizó con los niveles de  $\alpha$ -tubulina como proteína de referencia para el control de la carga.

#### - ELISA

La IL-8 se midió en el sobrenadante libre de células colectadas 48 horas después del tratamiento usando un kit ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) capaz de reconocer específicamente la proteína por la unión antígeno-anticuerpo. El complejo se reconoce y se une por un anticuerpo policlonal marcado con una enzima. Mediante el cálculo de la actividad enzimática después de la adición de sustrato, es posible tener un estimado directamente proporcional de la cantidad del antígeno de prueba. Los valores se informaron como pg/ml  $\pm$  SEM.

#### Resultados

Los resultados obtenidos con la transferencia a membrana conducido en células Caco2 muestran que los polisacáridos de cladodios de Nopal y extracto de hoja de olivo determinan respectivamente un porcentaje de inhibición de 27% a 33% (Figuras 3 y 4).

La habilidad para inhibir la expresión de IL-8 en el mismo cultivo celular, determinado por ELISA, se encontró que es 26% para los polisacáridos de cladodios de nopal y 24% para el extracto de hoja de olivo (Figura 4).

Además, en ambos experimentos, el tratamiento de las células Caco2 con una combinación de polisacáridos de cladodios de nopal y el extracto de hoja de olivo muestran un efecto sinérgico en porcentaje de inhibición tanto de ICAM-1 (76%) como IL-8 (70%, Figuras 3 y 4).

#### Conclusiones

La prueba *in vitro* muestra que el extracto de hoja de olivo determina un efecto sinérgico inesperado en la acción antiinflamatoria de los polisacáridos del extracto de cladodios de nopal, particularmente un efecto sinérgico para reducir la expresión de los marcadores de inflamación ICAM-1 e IL-8 inducidos en células Caco2 mediante el uso de sustancias proinflamatorias.

Los datos experimentales muestran que los polisacáridos del extracto de cladodios de nopal tienen una acción mucoadhesiva y una acción antiinflamatoria. Este último se mejora inesperadamente de una manera sinérgica por el extracto de hoja de olivo.

Estos dos efectos son útiles para la prevención y tratamiento de la enfermedad hemorroidal, sus complicaciones y dolencias relacionadas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Preparación combinada de un extracto de cladodios de nopal y un extracto de hojas de olivo, para uso simultáneo o separado en la prevención y tratamiento de la enfermedad hemorroidal, en donde el extracto de cladodios de nopal contiene una fracción de polisacáridos que tiene un PM de  $>10^4$  Da.
2. Preparación combinada de acuerdo con la reivindicación 1, para usar como agente mucoprotector para la mucosa anal y rectal y para prevenir o tratar la inflamación de la misma.
- 10 3. Preparación combinada para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el extracto de nopal contiene de 1 a 70% p/p de polisacáridos.
- 15 4. Preparación combinada para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dichos polisacáridos se extraen por un proceso que comprende comprimir cladodios seguido por la centrifugación del zumo y ultrafiltración del sobrenadante para obtener una solución acuosa enriquecida en la fracción de polisacáridos de PM de  $>10^4$  Da.
- 20 5. Preparación combinada para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el extracto de hoja de olivo se obtiene mediante el tratamiento de la hoja de olivo con solventes acuosos o hidroalcohólicos a temperatura ambiente o el calentamiento hasta 60-70°C, opcionalmente repitiendo el proceso de extracción y después eliminando el solvente al vacío a 40°C.
- 25 6. Preparación combinada para usar de acuerdo con la reivindicación 5 en donde dicho extracto de hoja de olivo se enriquece en biofenoles por un proceso que comprende cargar el extracto seco en una resina y eluir con etanol:agua 50:50 (v/v).
- 30 7. Composición que contiene un extracto de cladodios de nopal y un extracto de hojas de olivo, para usar en la prevención y tratamiento de la enfermedad hemorroidal, complicaciones de ésta y dolencias relacionadas, en donde el extracto de cladodios de nopal contiene una fracción de polisacáridos que tienen un PM de  $>10^4$  Da.
- 35 8. Composición para usar de acuerdo con la reivindicación 7, que contiene además extractos de botones de alcaparro, antocianósidos de naranjas rojas, arroz negro o de otras fuentes naturales y sus combinaciones.
- 40 9. Composición para usar de acuerdo con la reivindicación 7, que contiene además uno o más ingredientes seleccionados de Castaño de Indias, Rusco o extractos de Ciprés, fitoesteroides, extracto de Hamamelis, óxido de zinc, calamina, fenilefrina HCl, sulfato de efedrina, epinefrina y epinefrina HCl y antiinflamatorios esteroidales.
- 45 10. Composición para usar de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dichos polisacáridos se extraen por un proceso que comprende comprimir los cladodios seguido por la centrifugación del zumo y ultrafiltración del sobrenadante para obtener una solución acuosa enriquecida en la fracción de polisacáridos de Pm de  $>10^4$  Da.
- 50 11. Composición para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en donde los polisacáridos de cladodios de nopal están en cantidades de 0.5% a 50% p/p y otros activos están en cantidades de 1% a 30% (p/p).
- 55 12. Composición para usar de acuerdo con las reivindicaciones 7-9, en donde el extracto de hoja de olivo se obtiene mediante el tratamiento de la hoja de olivo con solventes acuosos o hidroalcohólicos a temperatura ambiente o el calentamiento hasta 60-70°C, opcionalmente repitiendo el proceso de extracción y después eliminando el solvente al vacío a 40°C.
13. Composición para usar de acuerdo con las reivindicaciones 7-12, que es adecuada para la administración oral, intrarrectal o tópica.
14. Composición para usar de acuerdo con la reivindicación 13, que está en forma de solución oral, suspensión oral, emulsión oral, tabletas, cápsulas, polvos y bolsas para la preparación extemporánea de suspensiones orales o emulsiones orales, cremas, ungüentos, espumas, geles, preparaciones de aerosol, supositorios.
15. Composición para usar de acuerdo con las reivindicaciones 7-14, que se selecciona de:

i) cápsula que tiene la siguiente composición:

<b>Componentes</b>	<b>mg/cápsula</b>
Extracto de cladodios de nopal	200-400 mg
Extracto de hoja de olivo	200-400 mg
Lactosa	Hasta llenar cápsula

5

ii) gel tópico/intrarrectal que tiene la siguiente composición:

<b>Componentes</b>	<b>% p/p</b>
Natrosol (hidroxietilcelulosa)	1.75
Extracto de cladodios de nopal	0.5 - 10
Extracto de hoja de olivo	0.5 - 10
Propilenglicol	10.00
Citrato sódico	0.30
Metabisulfito sódico	0.50
Edetato disódico	0.10
p-Hidroxibenzoato de metilo	0.20
p-Hidroxibenzoato de propilo	0.05
Agua destilada	Hasta 100gr

iii) supositorio que tiene la siguiente composición:

<b>Componentes</b>	<b>mg/supositorio</b>
Extracto de cladodios de nopal	200-400 mg
Extracto de hoja de olivo	200-400 mg
BHA	0.15 mg
BHT	0.15 mg
Witepsol S 55	Hasta llenar

10

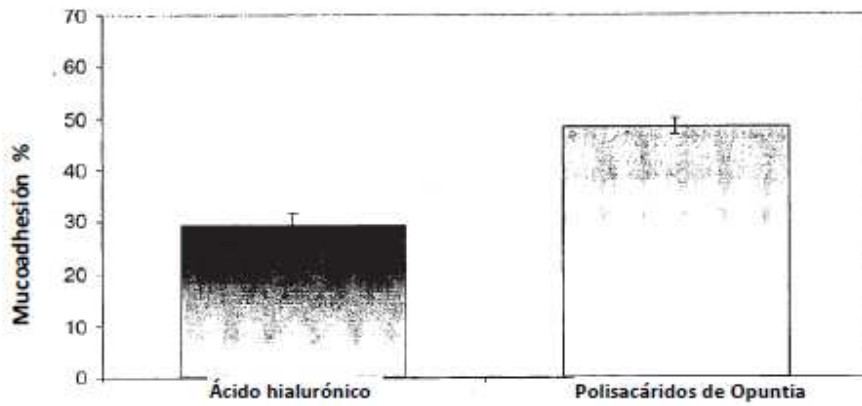
iv) ungüento que tiene la siguiente composición:

<b>Componentes</b>	<b>% p/p</b>
Extracto de cladodios de nopal	100 -200 mg
Extracto de hoja de olivo	100-200 mg
Macrogol 400	55 g
Macrogol 4000	39.9 g
Agua destilada	Hasta 100 g

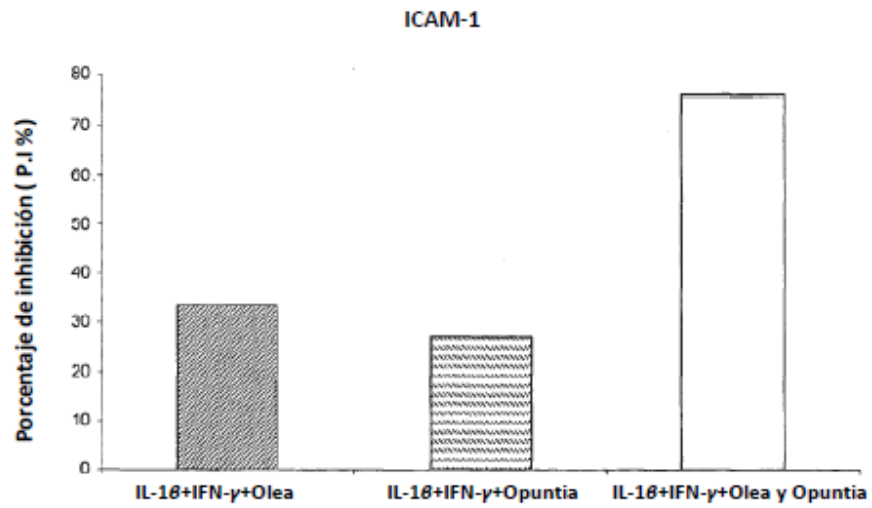
**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**

