

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 790**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/53** (2006.01)

**A61P 3/04** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2008 E 08793448 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2178545**

54 Título: **Fracción de extracto de hoja de melisa que tiene actividades inhibitoras de MMP y de angiogénesis, y composición que comprende la misma**

30 Prioridad:

**23.08.2007 KR 20070084929**

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

**03.07.2014**

73 Titular/es:

**ANGIOLAB, INC. (50.0%)  
Bio-Diagnostic Fusion Technology Center Expo  
Park 3-1 Doryong-dong Yuseong-gu  
Daejeon 305-340 , KR y  
KIM, MIN-YOUNG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KIM, MIN YOUNG;  
HAHM, JONG CHEON;  
PARK, BYUNG YOUNG;  
PARK, EUN KYU y  
LEE, HEE SUK**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 472 790 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

Fracción de extracto de hoja de melisa que tiene actividades inhibitoras de MMP y de angiogénesis, y composición que comprende la misma

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a una fracción de acetato de etilo de hoja de melisa que tiene excelentes actividades inhibitoras de MMP y de angiogénesis, y una composición que comprende la misma. En particular, la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa se caracteriza porque la hoja de melisa se extrae con alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> al 70-80 % y después el extracto de alcohol concentrado se suspende en agua y se fracciona con acetato de etilo y se seca, obteniéndose la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa.

10

**Técnica anterior**

15

La melisa (*Melissa officinalis*), una hoja perenne de la familia de las lamiáceas, también se denomina hoja de limón, toronjil o cidronela, como denominaciones comunes y populares.

20

Los constituyentes claves de la *Melissa officinalis* son flavonoides, ácidos terpénicos, aceites volátiles, glicósidos de los compuestos alcohólicos y fenólicos y derivados de ácido cafeico. Especialmente, como flavonoides son componentes abundantes cinarósido, cosmosina, ramnocitrina e isoquercitrina y como ácido terpénico es un componente el ácido ursólico. El ácido rosmarínico como derivados de ácido cafeico es el componente más abundante (aproximadamente el 4,7 %), y geranial, neral, citronelal y eugenol son componentes bien conocidos como aceites volátiles contenidos en el extracto de hoja de melisa.

25

El ácido rosmarínico, un componente no volátil abundante de la hoja de melisa, tiene un efecto potente antiinflamatorio y antipirético, y se han usado aceites esenciales contra la depresión, cefalea neurogénica, disminución de la memoria, neuralgia, fiebre y también es bien conocido por tener efectos sedantes, antibacterianos, antiviricos, antioxidantes y antihormonales. Recientemente, el extracto de hoja de melisa se ha incluido entre los activadores de la circulación sanguínea, que fomentan la dilatación de vasos sanguíneos periféricos.

30

La angiogénesis es el proceso de generación de nuevos vasos sanguíneos capilares. La neovascularización está regulada estrechamente, y tiene lugar durante el desarrollo embrionario, la remodelación de tejido, la cicatrización de heridas y ciclos periódicos de desarrollo del cuerpo lúteo (Folkman y Cotran, Relation of vascular proliferation to tumor growth, Int Rev Exp Pathol 16 207-248, 1976).

35

Las células endoteliales se desarrollan muy lentamente en comparación con otros tipos de células del organismo. Sin embargo, la proliferación de células endoteliales está inducida por citocinas de proangiogénesis, enzimas hidrolíticas activas que liberan mediadores angiogénicos de la matriz extracelular o la estimulación de factores angiogénicos.

40

En general, el proceso de angiogénesis es la degradación de la membrana basal de vasos sanguíneos, la migración de células endoteliales y la formación de lumen mediante proliferación y diferenciación de células endoteliales. Uno de los eventos principales en el proceso de angiogénesis es la ruptura de la matriz extracelular antes de la formación de los vasos sanguíneos capilares. La enzima más importante de degradación de matriz es la metaloproteinasa de matriz (MMP).

45

Cuando tiene lugar un fallo en la regulación de la angiogénesis o las MMP están sobreactivadas, tiene lugar una angiogénesis patológica (Polverini PJ, Critical Reviews in Oral Biology, 6(3), 230-247(1995); Arup Das y col., Progress in Retinal and Eye Research, 22 (2003) 721-748; Nick Di Girolamo y col., IOVS, agosto de 2001, Vol. 42, Nº 9, 1963-1968; Patricia Lee y col., Survey of ophthalmology, Vol 43, Nº 3, nov-dic 1998, 245-269; D.B. Holland y col., British Journal of Dermatology 2004, 150, 72-81; Anthony H Vagnucci Jr y col., The Lancet, Vol. 361, 15 de febrero, 2003, 605-608; Berislav V. Zlokovic, Trends in Neuroscience, Vol. 28, Nº 4, abril de 2005, 202-208; Jaap G. Neels y col., The FASEB Journal express artículo 10. 1096/fj.03-1101fje. Publicado en línea el 14 de abril de 2004; D.L. Crandall y col., Microcirculation, 4, 1997, 211-232; G. Voros y col., Endocrinology, 146, 2005, 4545-4554; M.A. Rupnick y col., PNAS, 99, 2002, 10730-10735; E. Brakenhielm y col., Circ. Res., 94, 2004, 1579-1588; H.R. Lijnen y col., Arterioscler Thromb Vasc Biol., 22. 2002, 374-379; D. Demeulemeester y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 329, 2005, 105-110, etc.).

50

60

Desarrollo de cáncer y metástasis

Angioma, angiofibroma, deformidad vascular y enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis, angiostenosis, esclerosis edémica y estenosis;

65

Enfermedades oftalmológicas tales como retinopatía diabética, degeneración macular (incluida la degeneración macular relacionada con la edad), pterigión, degeneración de la retina, angiogénesis en implante de córnea,

glaucoma angiogénico, enfermedades angiogénicas de la córnea tales como sinequia de la córnea y sinequia del iris, fibroplasias retrolentales, conjuntivitis granular, úlcera de córnea, retinopatía de cuerpo vítreo proliferativa, retinopatía inmadura, inflamación de ojo en ojos, córnea cónica, síndrome de Sjogren, miopía, tumores oculares y rechazo en implante de córnea;

5  
Obesidad;

Enfermedades crónicas tales como artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis séptica, osteopatía mediada por MMP y pérdida degenerativa de cartílago después de una lesión traumática articular;

10  
Enfermedades inflamatorias tales como inflamación del sistema nervioso central y enfermedad inflamatoria del intestino;

15  
Enfermedades dermatológicas tales como psoriasis, telangiectasia, granuloma piogénico, dermatitis seborreica y acné;

Enfermedad de Alzheimer;

20  
Sinequia de la córnea, proteinuria, aneurisma aórtico abdominal, tejido nervioso desmielinizado, fibrosis hepática, enfermedad nefroglomerular, ruptura prematura de la membrana fetal, enfermedades periodontales tales como gingivitis y periodontitis.

25  
En particular, la angiogénesis tiene un papel muy importante en el desarrollo y la metástasis de células cancerosas. Los nuevos vasos sanguíneos no solo suministran nutrientes y oxígeno para un desarrollo rápido de la células cancerosas, sino que también proporcionan un acceso a la circulación para la evolución de metástasis [Folkman y Tyler, Cancer Invasion and metastasis, Biologic mechanisms and Therapy (S.B. Day ed.) Raven press, Nueva York, 94-103(1977); Polverini PJ, Critical Reviews in Oral Biology, 6(3), 230-247(1995)].

30  
Los pacientes con cáncer mueren debido a la metástasis, y la quimioterapia y la inmunoterapia usadas actualmente en el tratamiento de cáncer no pueden contribuir a la supervivencia de pacientes con cáncer debido a la falta de efectos antimetastásicos.

35  
La artritis, una enfermedad inflamatoria bien conocida, se inicia como enfermedad autoinmunitaria. No obstante, el desarrollo de células endoteliales vasculares en la cavidad sinovial se activa mediante las citocinas inflamatorias, que finalmente destruyen el cartílago en la articulación. En otras palabras, la proliferación de células sinoviales y células endoteliales en la cavidad sinovial junto con citocinas que inducen la inflamación induce angiogénesis y formación de pannus, que desempeñan el papel principal en la destrucción de cartílago (Koch AE, Polverini PJ y Lcibovich SJ, Arth Rheum 29, 471-479, 1986; Stupack DG, Storgard CM y Cheresh DA, Braz J Med Biol Rcs 32, 578-581, 1999 Koch AE, Arthritis Rheum 41, 951-962, 1998). Mientras tanto, se ha demostrado también que la estromelisinina, en artritis y en lesión traumática de las articulaciones, se reconoce que tiene un papel importante en la activación de procólagenasa para activar colagenasa [Murphy, G. y col., Biochem. J. 248, 265-268 (1987)]. Por lo tanto, la regulación a la baja de la actividad de MMP puede evitar el progreso de la artritis.

45  
Mucha gente pierde la visión a lo largo del mundo debido a diversas enfermedades oculares. Muchos pacientes se quedan ciegos debido a la infiltración de las células sanguíneas capilares en el humor vítreo (Jeffrey MI y Takayuki A, J Clin Invest 103, 1231-1236, 1999). Degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, retinopatía de prematuridad, glaucoma angiogénico, enfermedades angiogénicas de la córnea son enfermedades angiogénicas oculares típicas [Adamis AP, Aiello LP y D'Amato RA, Angiogenesis 3, 9-14(1999)]. La retinopatía diabética, una complicación de la diabetes, está provocada por la ruptura de capilares y por el cubrimiento de la hemorragia de la superficie de la retina.

50  
La colagenasa, la gelatinasa y la estromelisinina se han implicado en la destrucción de la matriz extracelular de la córnea. Se piensa que este es un mecanismo importante de morbilidad y pérdida de la vista en una serie de enfermedades oculares ulcerantes, en particular las seguidas por infección o daño químico (Bums, F.R. y col., Invest Ophthalmol and Visual Sci, 32, 1569-1575, 1989). Las MMP presentes en el ojo durante la ulceración se han derivado bien endógenamente de leucocitos o fibroblastos infiltrantes o exógenamente de microbios.

55  
La psoriasis está provocada por la proliferación extremadamente activa de queratinocitos. El desarrollo rápido de células requiere un suministro suficiente de sangre, y la angiogénesis está inducida anormalmente en la psoriasis (Folkman J., J Invest Dermatol 59, 40-48, 1972).

60  
Las colagenasas, segregadas por la estimulación inflamatoria y por microbios, descomponen el colágeno en el tejido conectivo gingival y, finalmente, provocan periodontitis. Las actividades de colagenasa y estromelisinina se han identificado en fibroblastos aislados de encía inflamada y los niveles de enzima se han correlacionado con la gravedad de la gingivitis observada (Beeley, N.R.A. y col., anteriormente, en general, C.M. y col., J Periodontal Res, 22, 81-88, 1987).

Las MMP se correlacionan con la patogénesis del SNC (sistema nervioso central) que destruye mielina o la barrera hematoencefálica. También se ha informado que la MMP está relacionada con la acumulación de proteínas beta-amiloides en la enfermedad de Alzheimer [Yong, VW. y col., Trends Neurosci 21(2), 75-80(1998)].

Se han asociado niveles excesivos de gelatinasa-B en el líquido cefalorraquídeo con la incidencia de esclerosis múltiple y otros trastornos neurológicos [Beeley, N.R.A. y col., anteriormente; Miyazaki, K. y col., Nature 362, 839-841(1993)], y contribuyen a la degradación y la acumulación de proteína beta-amiloides [Backstrom JR y col., J neurosci 16(24), 7910-9 (1996)].

Informes recientes han mostrado también que la actividad de MMP-1 está muy inducida en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y el MMP-3 que activa la proenzima de MMP también está implicado en la patofisiología de la enfermedad (Leake A, Morris CM, & Whateley, J Neurosci Lett 291, 201-3, 2000; Yoshiyama Y, Asahina M, & Hattori T, Acta Neuropathol (berl), 99, 91-5, 2000).

La degradación de la membrana basal por MMP es un procedimiento muy importante de invasión de cáncer, metástasis y también angiogénesis. Por lo tanto, la sobreexpresión de MMP puede estimular angiogénesis, invasión de cáncer y metástasis.

En caso de adenocarcinoma, las células cancerosas gástricas proximales invasivas expresan la forma de 72 kD de colagenasa de tipo IV [Schwartz, G.K. y col., Cancer 73, 22-27(1994)]. Células de embrión de rata transformadas con oncogenes Ha-ras y v-myc o con Ha-ras solo son metastásicas en ratones atímicos y liberan la gelatinasa/colagenasa de 92 kDa (MMP-9) [Bernhard, E.J. y col., Proc. Natl. Acad. Sci 91,4293-4597(1994)].

Por lo tanto, pueden desarrollarse inhibidores de angiogénesis o inhibidores de MMP para los productos terapéuticos de estas enfermedades.

A este respecto, los inventores han divulgado en el registro KR N° 10-550.298 que el extracto de hoja de melisa tenía efecto antiangiogénico mediante ensayos *in vitro* tales como formación de tubos por HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana) y en ensayos *in vivo* tales como el modelo de Matrigel de ratón y el ensayo CAM.

Además, los inventores han divulgado en el registro KR N° 10-473.688 que el extracto de hoja de melisa tenía un efecto de inhibición en la MMP (metaloproteinasa de matriz) que es importante para degradar la membrana basal en el proceso de la angiogénesis.

## Exposición de la invención

### Problema técnico

Los inventores completan la presente invención mediante las investigaciones para obtener una fracción de hoja de melisa más activa que tenga excelentes actividades inhibitoras de MMP y de angiogénesis.

### Solución técnica

Es un objeto de la presente invención proporcionar una fracción de acetato de etilo de hoja de melisa que tenga excelentes actividades inhibitoras de MMP y de angiogénesis, y una composición que comprenda la misma.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra el efecto inhibitor de ALS-L1023 sobre la actividad de MMP;

la figura 2 es una fotografía que muestra el efecto inhibitor de ALS-L1023 sobre la formación de tubos por HUVEC;

la figura 3 es un gráfico que muestra el resultado de un ensayo de Matrigel de ratón para analizar el efecto inhibitor de ALS-L1023 sobre la angiogénesis;

la figura 4 son fotografías microscópicas de tejido hepático que muestran la reducción de esteatosis hepática e infiltración de células inflamatorias después de la alimentación de ratas obesas inducidas con una dieta rica en grasas con una dosis alta de ALS-L1023 en comparación con el grupo control de vehículo;

la figura 5 son fotografías microscópicas de la zona de adipocitos en tejido adiposo retroperitoneal después de la alimentación de ratas obesas inducidas con una dieta rica en grasas con una dosis media y alta de ALS-L1023 en comparación con el grupo control de vehículo;

la figura 6 es una fotografía que muestra el efecto inhibitor de ALS-L1023 en el progreso de degeneración macular

relacionada con la edad exudativa mediante la administración por vía oral de ALS-L1023;

la figura 7 es un gráfico que muestra los cambios en el peso corporal de ratas según el ensayo de toxicidad con una sola dosis por vía oral de 2000 mg/kg de ALS-L1023;

5 la figura 8 es un gráfico que muestra los cambios en la temperatura corporal de ratas según el ensayo de toxicidad con una sola dosis por vía oral de 2000 mg/kg de ALS-L1023; y

10 la figura 9 es un gráfico que muestra los valores de peso de órganos relativos, mostrados como porcentaje del peso corporal total según el ensayo de toxicidad con una sola dosis por vía oral de 2000 mg/kg de ALS-L1023.

### **Mejor forma de llevar a cabo la invención**

15 En consecuencia, la presente invención proporciona una fracción de acetato de etilo de hoja de melisa que tiene excelentes actividades inhibitoras de metaloproteinasas de matriz (MMP) y de angiogénesis.

La presente invención también se refiere a proporcionar una composición que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con la angiogénesis y enfermedades mediadas por MMP.

20 A continuación, la presente invención se describirá en detalle.

La fracción de acetato de etilo de hoja de melisa según la presente invención se caracteriza porque la hoja de melisa se extrae con alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> al 70~80 % y después el extracto de alcohol concentrado se suspende en agua y se fracciona con acetato de etilo y se seca, obteniéndose la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa.

En el procedimiento en la producción de una fracción de acetato de etilo de hoja de melisa según la presente invención, puede usarse hoja de melisa seca, sin secar o una mezcla de las mismas. Para una extracción eficaz, la hoja de melisa puede cortarse en trozos pequeños o pulverizarse.

30 Un extracto de alcohol de hoja de melisa puede extraerse mediante el procedimiento convencional, en este punto, el disolvente de extracción usado puede ser alcohol al 70~80 % de 5~10 volúmenes con respecto a la hoja de melisa. Los alcoholes pueden ser, preferentemente, metanol, etanol o una mezcla de los mismos.

35 En los ejemplos de la presente invención, el extracto de etanol al 75 % de hoja de melisa se suspende en agua y se fracciona con acetato de etilo y se seca, obteniéndose la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa (denominada ALS-L1023).

40 Los materiales solubles en agua y los materiales insolubles en agua pueden extraerse eficazmente usando alcohol al 70~80 % como disolvente de extracción. Y este procedimiento es eficaz para obtener materiales insolubles en agua que son solubles en acetato de etilo.

El acetato de etilo se selecciona como segundo disolvente de extracción considerando el rendimiento del producto, la toxicidad de los residuos y los contenidos relativos de sustancias de referencia.

45 Para la producción en masa de la fracción de hoja de melisa con actividad antiangiogénica excelente, se suspende el extracto de alcohol al 70~80 % de hoja de melisa en agua y se fracciona con acetato de etilo y se seca, obteniéndose la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa (denominada ALS-L1023 en los ejemplos siguientes).

50 Además, también puede ser que la hoja de melisa se extraiga con alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> al 70~80 %, se seque y el extracto de alcohol se suspenda en agua y después se fraccione con acetato de etilo, se seque y la fracción de acetato de etilo se resuspenda en agua y se seque, obteniéndose la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa.

La fracción de acetato de etilo de hoja de melisa obtenida se usó en ensayos animales y en ensayos preclínicos.

55 Los inventores hallaron que una fracción de acetato de etilo de hoja de melisa en la presente invención es excelente en inhibir actividades de angiogénesis y de MMP en comparación con otras fracciones obtenidas mediante otro reparto en disolvente. La fracción de acetato de etilo de hoja de melisa muestra las actividades más eficaces y excelentes en la inhibición de angiogénesis mediante ensayo de inhibición de MMP, ensayo de formación de tubos por HUVEC y ensayo de implante de Matrigel en ratones. Los inventores también han hallado que esta fracción inhibió la obesidad reduciendo el tejido adiposo, el tamaño de las células adiposas e induciendo la expresión génica relacionada con la oxidación de ácidos grasos.

65 Por lo tanto, está claro que una fracción de acetato de etilo de hoja de melisa según la presente invención puede usarse como agente antiangiogénico y agente inhibidor de MMP para el tratamiento o la prevención de

enfermedades relacionadas con la angiogénesis y enfermedades mediadas por MMP.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición que comprende una fracción de acetato de etilo de hoja de melisa.

5 Las enfermedades relacionadas con la angiogénesis y enfermedades mediadas por MMP que pueden tratarse o prevenirse mediante la composición de la presente invención incluyen, pero sin limitación, desarrollo de cáncer y metástasis; angioma, angiofibroma, deformidad vascular y enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis, angiostenosis, esclerosis edémica y estenosis; enfermedades oftalmológicas tales como retinopatía diabética, degeneración macular (incluida la degeneración macular relacionada con la edad), pterigión, degeneración de la retina, angiogénesis en implante de córnea, glaucoma angiogénico, enfermedades angiogénicas de la córnea tales como sinequia de la córnea y sinequia del iris, fibroplasias retrolentales, conjuntivitis granular, úlcera de córnea, retinopatía de cuerpo vítreo proliferativa, retinopatía inmadura, inflamación de ojo en ojos, córnea cónica, síndrome de Sjogren, miopía, tumores oculares y rechazo en implante de córnea; obesidad; enfermedades crónicas inflamatorias tales como artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis séptica, enfermedades inflamatorias tales como inflamación del sistema nervioso central y enfermedad inflamatoria del intestino; osteopatía mediada por MMP y pérdida degenerativa de cartílago regresiva; enfermedades dermatológicas tales como psoriasis, telangiectasia, granuloma piogénico, dermatitis seborreica y acné; enfermedad de Alzheimer; sinequia de córnea, proteinuria, aneurisma aórtica abdominal, tejido nervioso desmielinizado, fibrosis hepática, enfermedad nefroglomerular, ruptura prematura de la membrana fetal, enfermedades periodontales tales como gingivitis y periodontitis.

La composición de la presente invención puede usarse en combinación con agentes antiangiogénicos conocidos o inhibidores de MMP conocidos.

25 En la presente invención, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa que se usa como agente para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con la angiogénesis y enfermedades mediadas por MMP, puede ser una composición farmacéutica o una composición alimentaria.

30 La composición farmacéutica de la presente invención también puede comprender aditivos farmacéuticamente y fisiológicamente aceptable tales como diluyentes, agentes dispersantes, tensioactivos, disolventes, agentes disgregantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de expansión, lubricantes, deslizantes o agentes aromatizantes.

35 La composición farmacéutica que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de la presente invención como un ingrediente activo puede formularse en combinación con excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

40 La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse en cualquier forma tal como gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, píldoras, jarabes, gotas, líquidos, soluciones, emulsiones o soluciones inyectables.

45 Por ejemplo, en la composición de tipo comprimido o cápsula, los ingredientes activos pueden unirse con vehículos farmacéuticamente aceptables inactivos y no tóxicos. Y pueden incluirse en caso de necesidad aglutinantes, lubricantes, disgregantes y formadores de color adecuados. Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen, pero sin limitación, almidón, gelatina, dextrina, maltodextrina, azúcar natural tal como glucosa o  $\beta$ -lactosa, edulcorante de maíz, goma acacia, goma natural y sintética tal como goma tragacanto y oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio. Los disgregantes incluyen, pero sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana, etc.

50 En la composición de tipo solución líquida, los vehículos farmacéuticamente aceptables son solución salina, agua estéril, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución de inyección de albúmina, solución de dextrosa, solución de maltodextrina, glicerina, etanol o solución mixta. Y aditivos generales tales como antioxidantes, solución tamponada, producto bacteriostático, etc. pueden coadyuvar esta composición. Usando procedimientos convencionales o el texto escrito de Remington's pharmaceutical Science (Mack Publishing co, Easton PA), la composición de la presente invención puede formularse en cualquier forma deseable según la enfermedad o los ingredientes.

60 Además, la composición alimentaria que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de la presente invención como ingrediente activo puede usarse como alimentos funcionales, suplementos dietéticos o aditivos alimentarios. En el caso de aditivos alimentarios, la composición alimentaria de la presente invención puede añadirse a carne, agua de bebida, chocolate, dulces, aperitivos, pizza, fideos instantáneos, fideos, goma de mascar, helados, bebidas alcohólicas, complejos vitamínicos o a comida saludable.

65 La presente invención proporciona el uso de una composición que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con la angiogénesis y enfermedades mediadas por MMP. La composición de la presente invención puede usarse en alimentación y en medicina para el

tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con la angiogénesis y enfermedades mediadas por MMP.

La presente invención también proporciona un procedimiento de tratamiento o de prevención de enfermedades relacionadas con la angiogénesis y enfermedades mediadas por MMP que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa.

Tal como se usa en el presente documento, "mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, siendo preferentemente el mamífero un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad que inducirá una respuesta biológica o médica en el animal o en el ser humano al que se le administra. Un personal médico capacitado puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz, así como también la dosis apropiada y la frecuencia de administración para lograr un resultado clínico óptimo. Una cantidad terapéuticamente eficaz variará en función de diversos factores tales como los tipos de enfermedad, la gravedad de los síntomas del paciente, contenido de ingredientes, edad, peso corporal, sexo del paciente individual, alimento, tiempo de administración, vía de administración, la relación de la composición, el periodo de tratamiento y de fármacos adicionales administrados conjuntamente. La composición de la presente invención puede administrarse en una dosis única, o como parte de un régimen de administración tal como de dosis múltiples, pudiendo ser la dosificación deseada de la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de 3 mg/kg ~ 250 mg/kg por día.

La composición de la presente invención puede administrarse por diversas vías, por ejemplo, pero sin limitación, por vía oral, rectal, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intramucosal, subcutánea, intradérmica, transdérmica, transcutánea, intravaginal, intrarrectal, nasal, ocular y/o intestinal.

**Modo de la invención**

Los ejemplos siguientes simplemente pretenden ilustrar adicionalmente la presente invención. No obstante, los ejemplos y ejemplos experimentales se muestran solo para una mejor comprensión de la presente invención sin limitar su alcance.

[EJEMPLOS]

Ejemplo 1. Producción de la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa

Para producir extracto de hoja de melisa con actividad antiangiogénica potente, la hoja de melisa se extrae con agua destilada, etanol acuoso al 50 %, etanol acuoso al 75 %, etanol al 100 % y metanol, respectivamente. El extracto bruto se centrifugó, se filtró, se concentró y después se liofilizó, obteniéndose un extracto en polvo. El polvo se almacena a 4 °C hasta su uso. El efecto antiangiogénico de los extractos se analizó mediante el ensayo de formación de tubos por HUVEC a una concentración de 50 µg/ml. Tal como se muestra en la tabla 1, tanto el extracto que incluía agua como los extractos de etanol al 50 %, al 75 %, al 100 % y metanol al 100 % mostraron un efecto de inhibición en el ensayo de formación de tubos por HUVEC. Especialmente, el extracto de etanol al 75 % tiene una actividad inhibitoria relativamente buena en comparación con otros extractos, por lo tanto se selecciona etanol al 75 % como disolvente de extracción principal.

Tabla 1

El efecto de extractos de melisa sobre la formación de tubos por HUVEC	
Muestras	Inhibición de formación de tubos por HUVEC
Control negativo	-
Extracto de agua	+
Extracto de etanol al 50 %	(+)
Extracto de etanol al 75 %	+(+)
Extracto de etanol al 100 %	+
Extracto de metanol al 100 %	+(+)

- : tubos formados (sin inhibición),  
 +/- : tubos casi parecidos al control (inhibición poco común),  
 + : los tubos están ligeramente desconectados (inhibición leve),  
 ++ : los tubos están muy desconectados (inhibición significativa),  
 +++ : ningún tubo formado,

Para encontrar la actividad antiangiogénica más potente de fracciones de hoja de melisa, el extracto de etanol al 75 % de hoja de melisa se repartió secuencialmente con hexano, acetato de etilo y butanol. Cada fracción se centrifuga,

se filtra, se concentra y después se liofiliza, obteniéndose una fracción en polvo. El polvo se almacena a 4 °C hasta su uso. El efecto antiangiogénico se analizó mediante el ensayo de formación de tubos por HUVEC a una concentración de 50 µg/ml, respectivamente. Tal como se muestra en la tabla 2, el acetato de etilo tiene la actividad antiangiogénica más potente.

5

Tabla 2

El efecto de fracciones sobre la formación de tubos por HUVEC	
Muestras	Inhibición de formación de tubos por HUVEC
Control negativo	-
Extracto de etanol al 75%	+(+)
Fracción de hexano	+/-
Fracción de acetato de etilo	++(+)
Fracción de butanol	+

- : tubos formados (sin inhibición),

+/- : tubos casi parecidos al control (inhibición poco común),

+ : los tubos están ligeramente desconectados (inhibición leve),

10 ++ : los tubos están muy desconectados (inhibición significativa),

+++ : ningún tubo formado,

15 En base a los resultados de estos ensayos, la producción en masa de la fracción de hoja de melisa con actividad antiangiogénica excelente se realizó tal como sigue; se suspende el extracto de alcohol al 75 % de hoja de melisa en agua y se fracciona con acetato de etilo y se seca, obteniéndose la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa (denominada ALS-L1023 en los ejemplos siguientes). Esta ALS-L1023 se usó en ensayos en animales y ensayos preclínicos.

20 El procedimiento de producción en masa de ALS-L1023 se describe en detalle a continuación.

25 Se extrajeron dos veces 100 kg secos de hoja de melisa con 350 l de etanol acuoso al 75 % a 83 °C durante 4 horas. El extracto se filtró con un filtro de 10 µm y se concentró a 30 l y después se fraccionó con 40 l de acetato de etilo dos veces. Después de lavar esta fracción con agua destilada, se concentró al volumen de 15 l y después se secó con aire caliente a 45 °C. Finalmente, se obtuvieron 5 kg de ALS-L1023 en forma de un polvo seco.

#### Ejemplo 2. Ensayo *in vitro* de ALS-L1023

##### (1) Ensayo de inhibición de MMP

30 Para investigar la inhibición de MMP por ALS-L1023 producida mediante producción en masa, se realizó un ensayo de actividad enzimática de MMP mediante un procedimiento espectrofluorométrico (Perkin-Elmer LS50B).

35 Las enzimas MMP que se usaron en el ensayo se prepararon mediante producción de proteínas recombinantes usando un sistema de baculovirus de AngioLab, Inc. Se usó un sustrato fluorométrico (Bachem N° de cat. M-2105) como sustrato para MMP-2 y MMP-9. Se añadió ALS-L1023 con diversas concentraciones al tampón de reacción que contenía la enzima MMP y el sustrato, y se midió la intensidad de la fluorescencia. La  $CI_{50}$  de ALS-L1023 para MMP-2 y MMP-9 fue de  $17,7 \pm 1,0$  µg/ml y  $12,3 \pm 1,4$  µg/ml, respectivamente.

40 La  $CI_{50}$  del extracto de etanol al 75 % de hoja de melisa para MMP-2 y MMP-9 fue de  $33,6 \pm 1,5$  µg/ml y  $26,0 \pm 1,7$  µg/ml, respectivamente. Por lo tanto, se confirma que la actividad de inhibición de MMP de ALS-L1023 se potenció en comparación con la del extracto de etanol al 75 % de hoja de melisa (figura 1).

##### (2) Actividad inhibidora en la formación de tubos por HUVEC

45 El ensayo de formación de tubos por HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana) es un ensayo *in vitro* que está estrechamente relacionado con la eficacia *in vivo*, y se investigó el efecto de ALS-L1023 sobre la formación de tubos por HUVEC.

50 Para realizar el ensayo de formación de tubos, las HUVEC se aislaron a partir de cordones umbilicales recién obtenidos. Las células se cultivaron y se identificaron mediante tinción inmunocitoquímica con anticuerpo anti-Factor VIII. Las HUVEC cultivadas dentro del pasaje 5 se cultivaron en Matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA, Estados Unidos) a 37 °C en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de ALS-L1023 durante 18 horas. La formación de tubos se observó usando el microscopio. Tal como se muestra en la figura 2, la ALS-L1023 producida mediante la producción en masa inhibió la formación de tubos a 50 µg/ml. La red capilar de tubos se desconectó con



la ALS-L1023 mientras que se observó una red capilar de tubos. Además, la ALS-L1023 inhibió la formación de tubos por HUVEC de un modo dependiente de la dosis, tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3

Inhibición de formación de tubos por HUVEC mediante ALS-L1023	
muestra (µg/ml)	Inhibición de formación de tubos por HUVEC
0 (control)	-
100	+
50	++
25	++

5

(3) Ensayo de citotoxicidad celular

Para analizar la citotoxicidad de ALS-L1023 sobre las HUVEC, se sembraron 5.000-10.000 células HUVEC por pocillo en una placa de 96 pocillos y se añadieron a cada pocillo concentraciones diferentes de ALS-L1023. La viabilidad de las células se analizó con el kit de proliferación celular a base de tetrazolio XTT (hidrato del ácido sodio-3'-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolio]-bis[4-metoxi-6-nitro]bencenosulfónico) (Roche, Alemania) y las células viables se midieron con el lector de placas de ELISA. La ALS-L1023 no afectó a la viabilidad de HUVEC a la concentración de 50 µg/ml, lo que demuestra la inhibición de la formación de tubos de HUVEC.

10

15 (4) Ensayo de Matrigel de ratón

El ensayo de implante de Matrigel de ratón se realizó para medir la inhibición de angiogénesis *in vivo* mediante ALS-L1023 cuantitativamente.

20

Se implantaron 0,4 ml de Matrigel que contenían 50 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y 50 unidades/ml de heparina mediante inyección por vía subcutánea a ratones C57BL/6. Se administraron por vía oral 0,5 mg de ALS-L1023 disuelta en etanol al 10 % por ratón dos veces al día durante 4 días. Se administró por vía oral etanol al 10 % al grupo control. El día 5 se retiró la epidermis del ratón y se recuperó el Matrigel y después se determinó la cantidad de hemoglobina en el Matrigel usando reactivo de Drabkin (Sigma, Estados Unidos).

25

Como se muestra en la figura 3, el contenido de hemoglobina en los Matrigel recuperados del grupo tratado con ALS-L1023 era reducido en comparación con el grupo control de vehículo. El porcentaje de inhibición de la angiogénesis mediante ALS-L1023 era del 33 %.

30

[Ejemplo de formulación]

Se añadieron excipientes adecuados a ALS-L1023 para mejorar su estabilidad y después se envasaron 250 mg del mismo en una cápsula dura. La relación de mezcla se describe en la tabla 4 siguiente.

35 Tabla 4

Relación de formulación de ALS-L1023	
Material bruto	Relación de mezcla (%)
ALS-L1023	60
Estearato de magnesio	1
Dióxido de silicio coloidal	1
Celulosa microcristalina	33
Laurilsulfato de sodio	5

Ejemplo 3. Efecto antiobesidad de la fracción de ALS-L1023

Con respecto a la obesidad inducida por dieta rica en grasas, se realizó el experimento siguiente para examinar el efecto inhibitor de ALS-L1023 sobre la grasa abdominal. La ALS-L1023 formulada como ingrediente activo se mezcló con un alimento rico en grasa de 45 kcal % (fabricado por Research Diets Inc., Estados Unidos) con un contenido del 0 (grupo control), el 0,1 % (bajo), el 0,25 % (medio) y el 0,5 % (alto) (forma formulada: 0, 0,17, 0,42, 0,83 %). Para la preparación del grupo control que no contenía ingrediente activo ALS-L1023, se mezclaron excipientes contenidos en la ALS-L1023 formulada con el alimento rico en grasas en un contenido del 0,33 % como dosis elevada. Después de un periodo de aclimatación de una semana, las ratas SD macho de 7 semanas de edad

40

45

se dividieron en grupos de 7 ratones por grupo y se alimentaron durante 12 semanas. Después, se midió su peso corporal y el peso de grasa abdominal, y se realizaron ensayos bioquímicos de la sangre y ensayos histopatológicos del hígado y el tejido adiposo.

5 (1) Peso corporal

Se midió el peso corporal el día de la adquisición, el día de inicio de la administración, una vez a la semana después del inicio de la administración y el día de la autopsia. Los resultados se resumen en la tabla 5, en la que el peso corporal medio del grupo control de vehículo aumentó constantemente de  $204,73 \pm 5,57$  g (antes de la administración) a  $633,63 \pm 43,08$  g (12 semanas después de la administración), y el peso corporal promedio del grupo de ALS-L1023 (grupos de dosis baja, media y alta) aumentó constantemente de  $210,10 \pm 5,19$  g,  $204,97 \pm 6,61$  g y  $208,01 \pm 7,65$  g (antes de la administración) a  $623,72 \pm 58,02$  g,  $588,69 \pm 33,76$  g y  $584,83 \pm 33,44$  g (12 semanas después de la administración). No hubo ninguna significación estadística entre el grupo control y los grupos de ALS-L1023. No obstante, el peso corporal medio del grupo de ALS-L1023 disminuyó de un modo dependiente de la dosis.

Tabla 5

Cambios en el peso corporal con la administración de ALS-L1023				
Contenido de ALS-L1023 (%)	0 (grupo control)	0,1 (grupo dosis baja)	0,25 (grupo dosis media)	0,5 (grupo dosis alta)
Peso corporal antes de la administración (g)	$204,73 \pm 5,57$	$210,10 \pm 5,19$	$204,97 \pm 6,61$	$208,01 \pm 7,65$
Peso corporal después de la administración (g)	$633,63 \pm 43,08$	$623,72 \pm 58,02$	$588,69 \pm 33,76$	$584,83 \pm 33,44$

20 (2) Ingesta de alimento

La ingesta diaria de alimento se determinó como sigue. Los comederos se llenaron con alimento en polvo y después se midió su peso. A las 24 h después de alimentar a los animales con el comedero, se midieron los pesos y se determina la diferencia en los pesos medidos como ingesta de alimento diaria. La medición se realizó el día del inicio de la administración y una vez a la semana después del inicio de la administración.

La ingesta media de alimento del grupo control de vehículo estaba en el intervalo de 18,46 a 22,73 g durante 12 semanas, y la ingesta media de alimento de los grupos de dosis baja, media y alta estaba en los intervalos de 17,14 a 21,84 g, 17,29 a 22,03 g y 16,99 a 20,84 g, respectivamente. No hubo una diferencia significativa en comparación con el grupo control de vehículo.

30 (3) Pesos de órganos y tejidos adiposos

Antes de la autopsia y la recogida de sangre, los animales se mantuvieron en ayunas durante un periodo de 18 h o superior y se sometieron a anestesia con éter, seguida por recogida de sangre y flebotomía. Se escindieron los tejidos adiposos mesentéricos, los tejidos adiposos epididimales y los tejidos adiposos retroperitoneales de la cavidad abdominal, y se pesaron. Se pesaron el hígado, corazón, riñones, bazo y páncreas.

Como resultado no hubo una diferencia significativa en los pesos de corazón, hígado, páncreas, riñón (derecho, izquierdo) y bazo entre los grupos control de vehículo y los grupos experimentales. Con respecto al peso del tejido adiposo mesentérico, en los grupos de dosis baja, media y alta fueron de  $15,90 \pm 4,36$  g,  $12,64 \pm 1,69$  g, y  $11,23 \pm 3,32$  g, respectivamente. Es decir, los grupos experimentales sufrieron una disminución de un modo dependiente de la dosis, en comparación con el grupo control de vehículo de  $15,16 \pm 4,41$  g. Con respecto al peso del tejido adiposo epididimal, en los grupos de dosis baja, media y alta fueron de  $17,74 \pm 3,37$  g,  $16,29 \pm 2,62$  g, y  $15,67 \pm 3,83$  g, respectivamente. Es decir, los grupos experimentales sufrieron una disminución de un modo dependiente de la dosis, en comparación con el grupo control de vehículo de  $20,80 \pm 4,41$  g, y se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en el grupo de dosis alta. Con respecto al peso del tejido adiposo retroperitoneal, en los grupos de dosis baja, media y alta fueron de  $27,20 \pm 5,76$  g,  $21,36 \pm 4,03$  g, y  $23,94 \pm 6,24$  g, respectivamente. Es decir, los grupos experimentales sufrieron una disminución de un modo dependiente de la dosis, en comparación con el grupo control de vehículo de  $29,73 \pm 3,23$  g, y se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en el grupo de dosis media. Con respecto al peso total del tejido adiposo abdominal, incluidos el tejido adiposo mesentérico, el tejido adiposo epididimal y el tejido adiposo retroperitoneal, en los grupos de dosis baja, media y alta fueron de  $60,84 \pm 11,66$  g,  $50,29 \pm 7,31$  g y  $50,84 \pm 11,84$  g, respectivamente. Es decir, los grupos experimentales sufrieron una disminución, en comparación con el grupo control de vehículo de  $65,69 \pm 10,13$  g, y se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en los grupos de dosis media y alta (véase la tabla 6).

Tabla 6

Cambios en el peso de órganos y tejido adiposo con la administración de ALS-L1023				
Contenido de ALS-L1023 (%)	0 (grupo control)	0,1 (grupo dosis baja)	0,25 (grupo dosis media)	0,5 (grupo dosis alta)
peso de tejido adiposo mesentérico (g)	15,16 ± 4,41	15,90 ± 4,36	12,64 ± 1,69	11,23 ± 3,32
peso de tejido adiposo epididimal (g)	20,80 ± 4,41	17,74 ± 3,37	16,29 ± 2,62	15,67 63,83**
peso de tejido adiposo retroperitoneal (g)	29,73 ± 3,23	27,20 ± 5,76	21,36 ± 4,03**	23,94 ± 6,24
peso total de tejido adiposo abdominal (g)	65,69 ± 10,13	60,84 ± 11,66	50,29 ± 7,31**	50,84 ± 11,84**

\*\* :  $p < 0,05$  en comparación con el grupo control

#### (4) Ensayos de sangre bioquímicos

5

En los ensayos de sangre bioquímicos, no hubo una diferencia significativa en índices hepáticos tales como niveles en suero de AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanine aminotransferasa) y ALP (fosfatasa alcalina) entre el grupo control y los grupos experimentales. Con respecto al nivel de colesterol en sangre total, en los grupos de dosis baja, media y alta fueron de  $88,07 \pm 14,35$  mg/dl,  $86,96 \pm 17,68$  mg/dl y  $79,90 \pm 10,45$  mg/dl, respectivamente. Es decir, los grupos experimentales sufrieron una disminución de un modo dependiente de la dosis, en comparación con el grupo control de vehículo de  $102,09 \pm 21,82$  mg/dl. Con respecto al nivel de triglicéridos, en los grupos de dosis baja, media y alta fueron de  $50,93 \pm 15,28$  mg/dl,  $46,63 \pm 11,77$  mg/dl y  $45,50 \pm 22,45$  mg/dl, respectivamente. Es decir, los grupos experimentales sufrieron también una disminución de un modo dependiente de la dosis, en comparación con el grupo control de vehículo de  $58,13 \pm 25,04$  mg/dl. Con respecto al nivel de LDL, en los grupos de dosis baja, media y alta fueron de  $9,56 \pm 2,67$  mg/dl,  $9,11 \pm 2,92$  mg/dl y  $8,56 \pm 2,26$  mg/dl, respectivamente. Es decir, los grupos experimentales sufrieron también una disminución de un modo dependiente de la dosis, en comparación con el grupo control de vehículo de  $12,31 \pm 3,70$  mg/dl. No obstante, no hubo una diferencia significativa en los niveles de glucosa, proteínas totales y albúmina entre el grupo control y los grupos experimentales. De este modo, con respecto a la administración de ALS-L1023, los niveles en suero de colesterol total, triglicéridos y LDL en los grupos experimentales sufrieron una disminución de un modo dependiente de la dosis, en comparación con el grupo control de vehículo (véase la tabla 7).

10

15

20

Tabla 7

Cambios en índices bioquímicos de la sangre con la administración de ALS-L1023				
Contenido de ALS-L1023 (%)	0 (grupo control)	0,1 (grupo dosis baja)	0,25 (grupo dosis media)	0,5 (grupo dosis alta)
colesterol total (mg/dl)	102,09 ± 21,82	88,07 ± 14,35	86,96 ± 17,68	79,90 ± 10,45
triglicéridos (mg/dl)	58,13 ± 25,04	50,93 ± 15,28	46,63 ± 11,77	45,50 ± 22,45
LDL (mg/dl)	12,31 ± 3,70	9,56 ± 2,67	9,11 ± 2,92	8,56 ± 2,26

#### (5) Ensayo histopatológico del hígado

25

Los hígados se pesaron y después se fijaron en solución de formalina tamponada neutra al 10 %, y después se realizó el procesamiento histopatológico rutinario. Las muestras de láminas de tejido se prepararon y después se tiñeron con H&E, y después se observaron en un microscopio para evaluar la esteatosis hepática. Como resultado, en el grupo control de vehículo se observó una acumulación excesiva de glóbulos de grasa en el lóbulo hepático de hepatocitos, que es el hallazgo de esteatosis hepática. Los cambios grasos microvesiculares o macrovesiculares se observaron principalmente alrededor de la vena portal hepática. La infiltración celular inflamatoria que tiene lugar en un estado avanzado de esteatosis hepática tuvo lugar principalmente entre hepatocitos hinchados o alrededor de los mismos, donde existía la esteatosis hepática. En un grado moderado de esteatosis hepática, tuvo lugar infiltración celular inflamatoria alrededor de las venas centrales. No se observaron otros hallazgos patológicos anormales.

30

35

En el grupo de dosis baja, también se observó esteatosis hepática, que fue similar a la observada en el grupo control de vehículo. En el grupo de dosis media, se observaron esteatosis hepática e infiltración celular inflamatoria ligeramente reducidas, en comparación con el grupo control de vehículo y el grupo de dosis baja.

En el grupo de dosis alta, se observó la inhibición de la esteatosis hepática o infiltración celular inflamatoria reducida, que fue similar a la observada en el grupo de dosis media (véase la figura 4). Los resultados sugieren que la ALS-L1023 ejerce efectos inhibidores sobre la misma.

5

(6) Área de adipocitos en el tejido adiposo

Los tejidos adiposos retroperitoneales escindidos se pesaron y después las muestras de tejido embebidas en parafina se prepararon mediante el procesamiento histológico rutinario y después se tiñeron con H&E. Se seleccionaron aleatoriamente 5 sitios de muestreo y el valor medio de 10 áreas de adipocitos adyacentes a cada sitio de muestreo se determinaron como área de adipositos de cada sujeto usando un programa informático de investigador en estereo (MicroBrighField, VT, Estados Unidos) conectado a un microscopio electrónico. Como se muestra en la figura 5, se observó la reducción en el área de adipocitos en los grupos de dosis media y alta, en comparación con el grupo control de vehículo. Se observó una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el grupo de dosis alta.

10  
15

En conjunto, cuando se alimentaron ratas obesas inducidas con dieta rica en grasas con ALS-L1023 durante 12 semanas, la ALS-L1023 ejerció efectos inhibidores sobre la obesidad, incluidos la reducción en el peso de tejido adiposo abdominal y en los niveles en suero de colesterol total y triglicéridos, el alivio de esteatosis hepática y la reducción del tamaño de adipocitos.

20

Ejemplo 4. Efecto de ALS-L1023 sobre enfermedades oculares neovasculares

Para evaluar la eficacia de ALS-L1023 sobre la neovascularización retinal, se inyectó a ratones con retinopatía inducida por oxígeno en el modelo animal de ROP (retinopatía de prematuridad) por vía peritoneal ALS-L1023 diluida en DMSO a una dosis de 25 mg/kg el día 13 después del nacimiento durante un periodo de 5 días.

25

Como resultando, se observaron neovascularización retinal y muchos vasos sanguíneos anormales en el grupo control de ROP, mientras que las retinas normales muestran patrones uniformes y compactos de vasos sanguíneos. De forma notable, la neovascularización reducida en la retina central y la retina periférica y el número más reducido de vasos sanguíneos anormales se observó en el grupo de ALS-L1023, en comparación con el grupo control de ROP. De este modo, se espera que la ALS-L1023 sea eficaz en la prevención y el tratamiento de neovascularización ocular.

30

Ejemplo 5. Efecto de ALS-L1023 sobre la degeneración macular

35

La cápsula de ALS-L1023 formulada se administró por vía oral a un paciente masculino al que se había diagnosticado degeneración macular relacionada con la edad exudativa tres veces al día con 2 cápsulas en cada ocasión durante 12 semanas. Después, se fotografió el área macular del paciente y se comparó el tamaño del área de degeneración macular con la fotografía tomada antes de la administración. Como se muestra en la figura 6, no se observó progresión en el área de degeneración macular. De este modo, se espera que la ALS-L1023 sea eficaz en la prevención y el tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad.

40

[Ejemplo experimental] Ensayo de seguridad de ALS-L1023

45

Se usó la hoja de melisa, de la que se aisló la sustancia de ensayo ALS-L1023, como alimento o medicina durante un periodo de tiempo largo, y se clasificó por US FDA como GRAS (considerada en general como segura). De este modo, la sustancia de ensayo ALS-L1023 se consideró como no tóxica y el presente experimento se realizó como un ensayo de toxicidad aguda (ensayo límite) mediante una dosis única por vía oral de 2000 mg/kg de ALS-L1023 según la instrucciones de OECD.

50

Se dividieron aleatoriamente diez ratas macho y diez ratas hembra en grupos control y experimentales, consistiendo cada uno en cinco animales, respectivamente. A los grupos control se administraron 1 ml/150 g (peso corporal) de aceite de maíz y a los grupos experimentales se administraron 2000 mg/kg de ALS-L1023 en aceite de maíz. Ya que la sustancia de ensayo ALS-L1023 no se disolvió en agua, se suspendió en aceite de maíz para usarla en el ensayo. La sustancia de ensayo se prepare el día de administración y se suspendió mediante agitador vortex antes de su administración.

55

En primer lugar se administró por vía oral a una rata, que se sometió a observación después durante 24 h. Después se administró por vía oral a dos ratas, que se sometieron después a observación durante 72 h. Después, se administró por vía oral a las 17 ratas restantes y se observaron para determinar hallazgos de toxicidad durante 30 min. Después, las observaciones se realizaron dos veces al día durante 14 días y el peso corporal y la temperatura se registraron cada día.

60

El último día del experimento, las ratas se sacrificaron usando CO<sub>2</sub> y se realizaron las autopsias. Los tejidos anormales examinados visualmente por el patólogo se escindieron y se sometieron a examen histológico.

65

Como resultado, en el caso de una dosis única por vía oral de 2000 mg/kg de ALS-L1023 en cada uno de las cinco ratas macho y hembra, no se observaron hallazgos de toxicidad significativos durante el transcurso del periodo de 14 días de observación.

5 No se observaron anomalías clínicas distintas ni en el grupo control ni el grupo experimental. No obstante, una rata hembra se volvió ligeramente excitada 60 min después de la administración, pero se mantuvo estable a los 90 min después de la administración.

10 Además, la administración de ALS-L1023 no afectó al peso corporal y a la temperatura corporal ni el grupo control ni el grupo experimental (véanse las figuras 7 y 8).

15 Los pesos relativos (%) de timo, corazón, bazo, riñón, hígado y cerebro con respecto al peso corporal total se muestran en la figura 9. Se observó un ligero aumento, pero estadísticamente significativo en el peso del hígado de la rata hembra del grupo control, en comparación con el de la rata hembra a la que se administró ALS-L1023, pero no en el de las ratas macho. No se encontraron hallazgos de autopsia anormales ni otros hallazgos peculiares.

20 Además, aunque algunos hallazgos anormales se detectaron visualmente por parte del patólogo, el examen histológico de los mismos no mostró evidencias de anomalía.

En consecuencia una dosis única por vía oral de 2000 mg/kg de ALS-L1023 no indujo ningún síntoma tóxico a lo largo del transcurso del periodo de observación.

#### **Aplicabilidad Industrial**

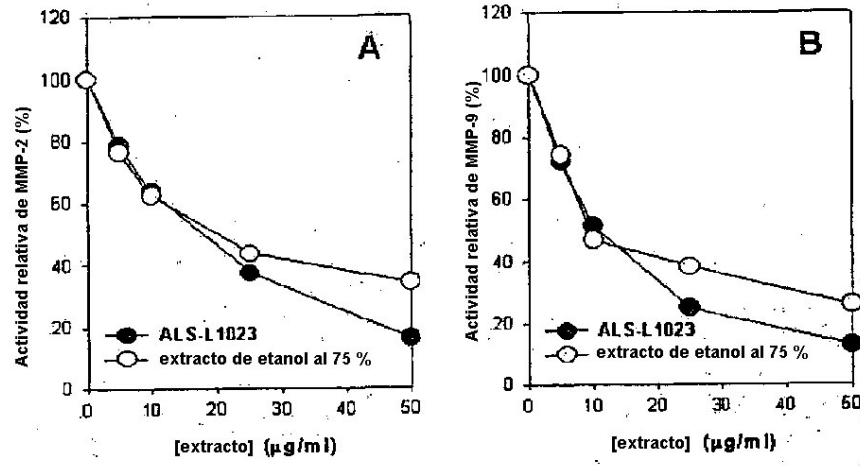
25 Una fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de la presente invención tiene una actividad potente y excelente antiangiogénica e inhibidora de MMP. Por lo tanto, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de la presente invención puede usarse como agente para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con la angiogénesis y enfermedades mediadas por MMP, tal como se establece en las reivindicaciones.

30

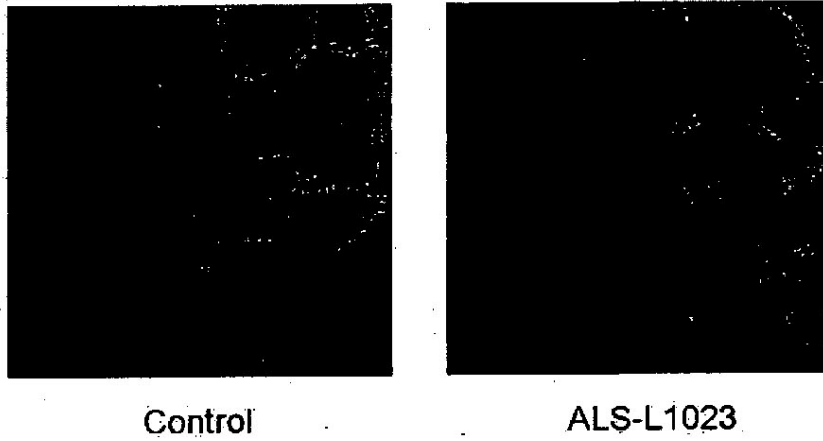
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica para uso en inhibir actividades de MMP 2 o MMP 9 (metaloproteinasa de matriz) y angiogénesis que comprende una fracción de acetato de etilo de hoja de melisa junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que la hoja de melisa se extrae con etanol o metanol al 70-80 % y se concentra, y después el extracto de etanol o metanol concentrado se suspende en agua y se fracciona con acetato de etilo, y se seca para obtener la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa.
- 10 2. Una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de la obesidad, que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de la reivindicación 1 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, causando dicha composición la reducción del tejido adiposo.
- 15 3. Una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de retinopatía diabética, degeneración macular, degeneración macular relacionada con la edad, pterigión, degeneración de la retina, neovascularización de injerto de córnea, glaucoma neovascular, enfermedad neovascular de la córnea, fibroplasia retrolental, tracoma, úlcera de la córnea, retinopatía inmadura, queratocono, síndrome de Sjogren, miopía, tumor ocular o rechazo de injerto después de queratoplastia, que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de la reivindicación 1 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 4. Una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento del desarrollo de cáncer y de metástasis que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de la reivindicación 1 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 5. Una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de hemangioma, angiofibroma, malformación vascular, arteriosclerosis, adhesión vascular, escleroderma o reestenosis, que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de la reivindicación 1 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 6. Una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis séptica, osteopenia mediada por MMP o pérdida degenerativa de cartílago después de una lesión traumática articular, que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de la reivindicación 1 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 7. Una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de psoriasis, telangiectasia, granuloma biogénico, dermatitis seborreica o acné, que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de la reivindicación 1 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 8. Una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de la reivindicación 1 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 9. Una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de concrecencia anormal de heridas, proteinuria, aneurisma aórtico abdominal, tejido nervioso desmielinizado, fibrosis hepática, enfermedades nefroglomerulares, ruptura prematura de la membrana fetal o enfermedades periodontales, que comprende la fracción de acetato de etilo de hoja de melisa de la reivindicación 1 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. La composición farmacéutica para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 10, estando formulada la composición en una forma de dosificación de gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, píldoras, jarabes, gotas, líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones o soluciones inyectables.

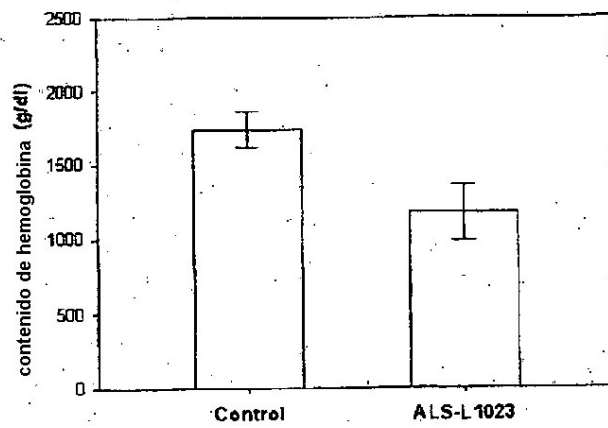
[Fig. 1]



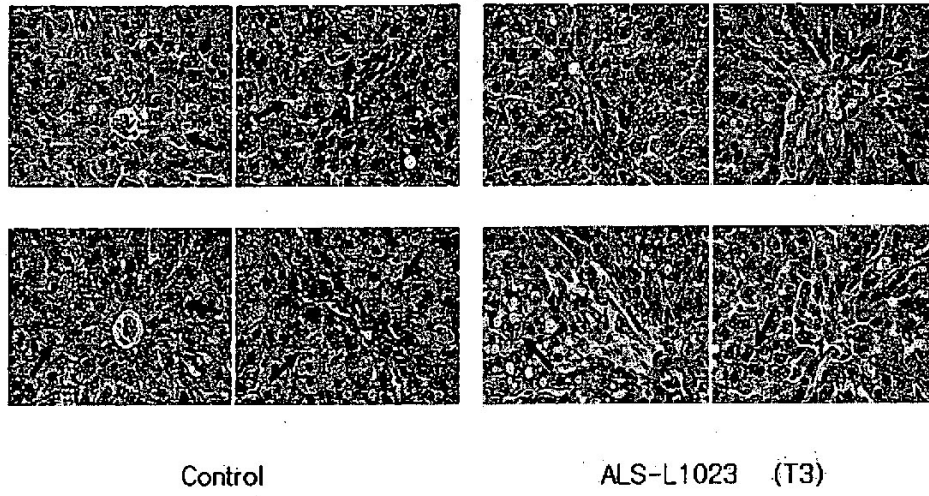
[Fig. 2]



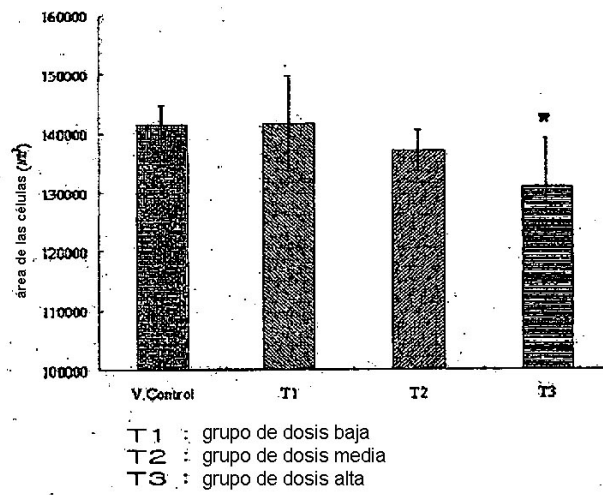
[Fig. 3]



[Fig. 4]

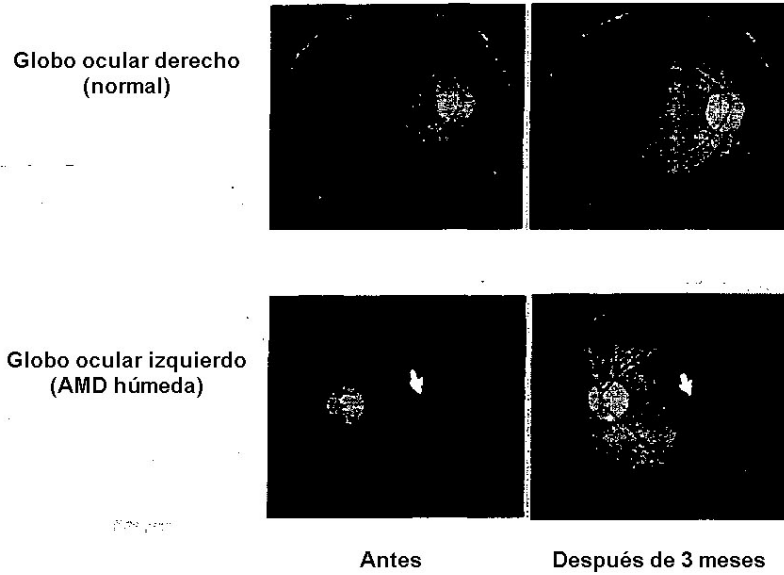


[Fig. 5]

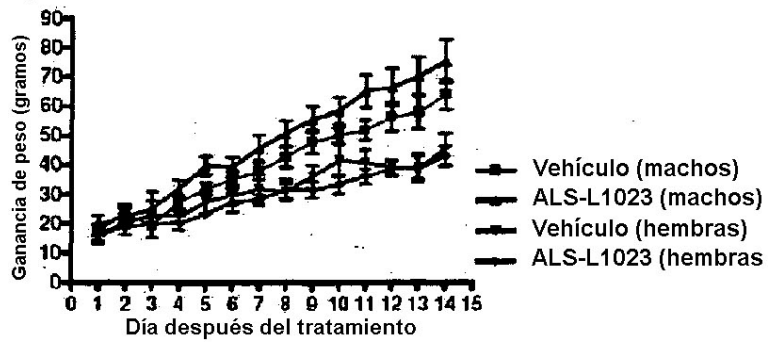




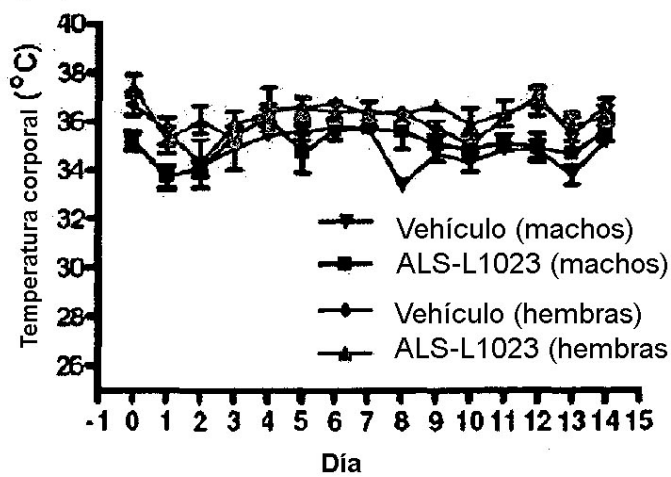
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

