

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 594**

51 Int. Cl.:

A61K 36/18 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61K 36/19 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2005 E 05742174 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 1747008**

54 Título: **Extractos en bruto de *Andrographis paniculata***

30 Prioridad:

28.04.2004 US 566477 P

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

24.04.2015

73 Titular/es:

**NUTRITION SCIENCE PARTNERS LIMITED
(100.0%)**

**For all designated states Nutrition Science
Partners Limited 22nd Floor, Hutchison House, 10
Harcourt Road
Hong Kong, HK**

72 Inventor/es:

**YAN, XIAOQIANG;
WANG, TAO;
MA, ZHIMING;
ZHANG, WEIHAN;
DUAN, JIFEN y
CAI, YU**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el
folleto original publicado por la Oficina
Europea de Patentes**

ES 2 534 594 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).

Extractos en bruto de *Andrographis paniculata***Descripción****5 ANTECEDENTES**

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), una citocina mononuclear, se produce predominantemente por monocitos y macrófagos. Posee diversas actividades biológicas: (1) destrucción de células cancerosas o inhibición del crecimiento de células cancerosas, (2) potenciamiento de la fagocitosis de granulocito neutrófilo, (3) destrucción de patógenos infecciosos, y (4) aumento de la expresión de moléculas de adhesión sobre células endoteliales vasculares durante las respuestas inflamatorias.

Los trastornos relacionados con la expresión de TNF- α incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, espondiloartropatías, enfermedad inflamatoria del intestino (incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), insuficiencia cardíaca crónica, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, sarcoidosis, polimiositis/dermatomiositis, psoriasis, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena aguda, enfermedad de Parkinson, complejo de demencia del SIDA, enfermedad de Alzheimer, depresión, septicemia, pioderma gangrenosa, hematosépticemia, choque séptico, síndrome de Behcet, enfermedad de injerto contra huésped, uveítis, granulomatosis de Wegener, síndrome de Sjögren, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, pancreatitis aguda, enfermedad periodontal, caquexia, lesión del sistema nervioso central, cáncer (por ejemplo, carcinomas de pulmón, carcinoma de esófago, adenocarcinoma gástrico y carcinoma de próstata), enfermedad respiratoria viral y obesidad. Véanse, por ejemplo, Ogata H. y col., *Curr Pharm Des.* 2003; 9(14): 1107-13; Moller D. R. y col., *J Inter Med.* 2003; 253(1): 31-40; Taylor P.C. y col., *Curr Pharm Des.* 2003; 9(14); Wilkinson N. y col., *Arch Dis Child.* 2003; 88(3): 186-91; Nishimura F. y col., *J Periodontol.* 2003; 74(1): 97-102; Weinberg J. M. y col., *Cutis.* 2003; 71(1): 41-5; Burnham E. y col., *Crit Care Med.* 2001; 29(3): 690-1; Sack M. y col., *Pharmacol Ther.* 2002; 94(1-2): 123-35; Bames P. J. y col., *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002; 42:81-98; Mageed R.A. y col., *Lupus* 2002; 11(12): 850-5; Tsimberidou A.M. y col., *Expert Rev Anticancer Ther* 2002; 2(3); Muller T. y col., *Curr Opin Investig Drugs.* 2002; 3(12): 1763-7; Calandra T. y col., *Curr Clin Top Infect Dis.* 2002; 22:1-23; Girolomoni G y col., *Curr Opin Investig Drugs.* 2002; 3(11); Tutuncu Z. y col., *Clin Exp Rheumatol.* 2002; 20(6 Suppl 28): S146-51; Braun J. y col., *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2002; 16(4): 631-51; Bames P. J. y col., *Novartis Found Symp.* 2001; 234: 255-67; discussion 267-72; Brady M. y col., *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 1999; 13 (2); Goldring M. B. y col., *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1(5): 817-29; Mariette X. *Rev Prat.* 2003; 53(5): 507-11; Sharma R. y col., *Int J Cardiol.* 2002; 85(1): 161-71; Wang C. X. y col., *Prog Neurobiol.* 2002; 67(2): 161-72; Van Reeth K. y col., *Vet Immunol Immunopathol.* 2002; 87(3-4): 161-8; Leonard B. E. y col., *Int J Dev Neurosci.* 2001; 19(3): 305-12; y Hays S.J. y col., *Curr Pharm Des.* 1998; 4(4): 335-48.

La interleucina-1 beta (IL-1 β), una citocina secretada por células tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas, media en una amplia variedad de respuestas inmunitarias e inflamatorias. Puede modular la producción de IL-1 β para tratar una variedad de trastornos, tales como artritis reumatoide, hematosépticemia, enfermedad periodontal, insuficiencia cardíaca crónica, polimiositis/dermatomiositis, pancreatitis aguda, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Alzheimer, osteoartritis, infecciones bacterianas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, uveítis, lesión del sistema nervioso central, enfermedad respiratoria viral, asma, depresión y esclerodermia. Véanse, por ejemplo, Taylor P.C. y col., *Curr Pharm Des.* 2003; 9(14): 1095-106; Dellinger R.P. y col., *Clin Infect Dis.* 2003; 36(10): 1259-65; Takashiba S. y col., *J Periodontol.* 2003; 74(1): 103-10; Diwan A. y col., *Curr Mol Med.* 2003; 3(2): 161-82; Lundberg I.E. y col., *Rheum Dis Clin North Am.* 2002; 28(4): 799-822; Makhija R. y col., *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2002; 9(4): 401-10; Chung K.F. y col., *Eur Respir J Suppl.* 2001; 34:50s-59s; Hallegua D. S. y col., *Ann Rheum Dis.* 2002; 61(11): 960-7; Goldring M. B. y col., *Expert Opin Biol Ther.* 2001; 1(5): 817-29; Mrak R. E. y col., *Neurobiol Aging.* 2001; 22(6); Brady M. y col., *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 1999; 13(2): 265-89; Van der Meer J. W. y col., *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 856:243-51; Rameshwar P. y col., *Acta Haematol.* 2003; 109(1): 1-10; de Kozak Y y col., *Int Rev Immunol.* 2002; 21(2-3): 231-53; Wang C.X. y col., *Prog Neurobiol.* 2002; 67(2): 161-72; Van Reeth K. y col., *Vet Immunol Immunopathol.* 2002; 87(3-4): 161-8; Stirling R. G. y col., *Br Med Bull.* 2000; 56(4): 1037-53; Leonard B.E. y col., *Int J Dev Neurosci.* 2001; 19(3): 305-12; Allan S.M. y col., *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 917:84-93; y Cafagna D. y col., *Minerva Med.* 1998; 89(5): 153-61.

55 Ciertos extractos de *Andrographis paniculata* se desvelan en:

Puri y col. (1993) *Journal of Natural Products*, 56, 7, p995-999

JP 2001058969

60

Habtemariam (1998), *Phytotherapy research*, John Wiley & Sons, p37-40

Townsend y col. (2001) *Biosciences Information Service*, Database accession no. PREV200100253996.

65

Gupta y col. (1993) *International Journal of Pharmacognosy*, vol. 31, no. 3, p198-204 CN1042077

CN1488376

Kakrani y Saluja (2001) Journal of natural remedies, Vol 2/1, p71-75

5 Zhao y col. (2002) Phytochemical Analysis, 13, p222-227

Saxena y col. (1998) Phytochemical Analysis, 11, p34-36

10 Balmain y Connolly (1972) Journal of the Chemical Society, Perkins transaction1, 12, p1247-1251

Singha y Dey (2003) Fitoterapia, 74, p692-694

Hancke y col. (1994) Phytotherapy Research, 9, p559-562

15 Melchior y col. (2000) Phytomedicine, 7(5), p341-350

Bhan y col. (2005) Scientia Horticulturae, 107, p386-391

20 Panossian y col. (1999) Phytomedicine, 6(3), p157-162

RESUMEN

25 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que un extracto de *Andrographis paniculata* inhibe la expresión de tanto TNF α como IL-1 β . El extracto, obtenido de la parte aérea de *Andrographis paniculata*, contiene 2-20 % en peso de andrografólido, 1-6 % en peso de 14-desoxi-andrografólido, 1-12 % en peso de 14-desoxi-11,12-deshidrógeno-andrografólido y 1-5 % en peso de neoandrografólido. Más preferentemente, el extracto contiene 3-8 % en peso de andrografólido, 3-5 % en peso de 14-desoxi-andrografólido, 7-9 % en peso de 14-desoxi-11,12-deshidrógeno-andrografólido y 2-4 % en peso de neoandrografólido. Se prefiere particularmente que el extracto contenga 4,2 % en peso de andrografólido, 4,4 % en peso de 14-desoxi-andrografólido, 8 % en peso de 14-desoxi-11,12-deshidrógeno-andrografólido y 2,1 % en peso de neoandrografólido.

35 El extracto en una forma de dosificación aceptable por vía oral se usa en un método para tratar un trastorno relacionado con TNF α o IL-1 β , es decir, enfermedad inflamatoria del intestino (incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa). El método incluye administrar a un sujeto en necesidad del tratamiento una cantidad eficaz del extracto anteriormente descrito.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 La presente invención incluye extractos para su uso en métodos para tratar una enfermedad inflamatoria del intestino administrando a un sujeto en necesidad de los mismos una cantidad eficaz del extracto anteriormente descrito. El término "una cantidad eficaz" se refiere a la cantidad del extracto que se requiere para conferir uno de los efectos anteriormente descritos en el sujeto. Las cantidades eficaces pueden variar, como se reconoce por aquellos expertos en la materia, dependiendo de la vía de administración, uso de excipiente y la posibilidad de co-uso con otros agentes. El término "tratar" se refiere a administrar el extracto a un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria del intestino, o tiene un síntoma del trastorno, o tiene una predisposición hacia el trastorno, con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, aumentar o afectar el trastorno, los síntomas del trastorno, o la predisposición hacia el trastorno.

50 Para preparar un extracto para su uso en la presente invención, puede sumergirse la parte aérea de *Andrographis paniculata* en uno o más disolventes adecuados, por ejemplo, etanol, metanol y acetona; separar el líquido del residuo sólido; y concentrar el líquido. El extracto así obtenido puede procesarse adicionalmente. Por ejemplo, pueden eliminarse impurezas o modificar la relación de los componentes por cromatografía.

55 Una composición oral puede ser cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral que incluye, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, emulsiones y suspensiones, dispersiones y disoluciones acuosas. Vehículos comúnmente usados para comprimidos incluyen lactosa y almidón de maíz. Agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, también se añaden normalmente a los comprimidos. Para administración por vía oral en una forma de cápsula, diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz secado. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el principio activo puede suspenderse o disolverse en una fase aceitosa combinada con emulsionante o agentes de suspensión. Si se desea, pueden añadirse ciertos edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

65 Un vehículo en una composición farmacéutica debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el principio activo de formulación (y preferentemente, capaz de estabilizarlo) y no perjudicial para el sujeto que va a tratarse. Por ejemplo, pueden utilizarse agentes solubilizantes, tales como ciclodextrinas (que forman complejos más solubles específicos con uno o más de compuestos activos del extracto), como excipientes farmacéuticos para la

administración de los compuestos activos. Ejemplos de otros vehículos incluyen dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, celulosa, laurilsulfato de sodio y D&C Yellow n° 10.

5 Puede usarse un ensayo *in vitro* adecuado para evaluar preliminarmente la eficacia del extracto anteriormente descrito en la inhibición de la expresión de TNF α o la expresión de IL-1 β . El extracto puede examinarse adicionalmente para su eficacia en el tratamiento de un trastorno de TNF α relacionado o un trastorno de IL-1 β relacionado por ensayos *in vivo*. Por ejemplo, el extracto puede administrarse a un animal (por ejemplo, un modelo de ratón) que tiene un trastorno de TNF α o IL-1 β relacionado y entonces se accede a sus efectos terapéuticos. Basándose en los resultados, también puede determinarse un intervalo de dosificación apropiado y vía de administración.

15 Sin más elaboración, se cree que la descripción anterior ha posibilitado adecuadamente la presente invención. Los siguientes ejemplos específicos deben interpretarse, por tanto, como simplemente ilustrativos, y no limitantes del resto de la divulgación de ningún modo cualquiera que fuere.

Preparación de un extracto de *Andrographis paniculata*

20 Se suspendió polvo de la parte aérea secada de *Andrographis paniculata* (1 kg) en etanol al 85 %. La suspensión se sometió a reflujo durante dos horas y se filtró. El residuo se extrajo de nuevo con etanol al 85 %. Las disoluciones de etanol combinadas se enfriaron y se concentraron proporcionando 105 g del extracto deseado. El análisis de HPLC muestra que el extracto contuvo 4,0 % de andrografólido.

Ensayo *in vitro*

25 Se realizó un ensayo *in vitro* para evaluar la eficacia del extracto de *Andrographis paniculata* en la inhibición de la expresión de TNF α y la expresión de IL-1 β .

30 Se aislaron células monocíticas de sangre periférica (PBMC) de sangre fresca usando Ficoll-Paque Plus (Amersham Bioscience) según el protocolo recomendado por el fabricante. Las células se suspendieron en medio RPMI 1640 que contenía 10 % de SBF a una concentración de 1×10^5 células/ml y se sembraron en una placa de 96 pocillos (1×10^4 células totales en cada pocillo). Cada reacción se llevó a cabo en tres pocillos.

35 Se añadieron 10 μ l del extracto de *Andrographis paniculata* en DMSO a cada pocillo (concentraciones finales: 0,1, 0,3, 1, 3, 10 y 30 μ g/ml). Se usaron pocillos que contenían dexametasona (CalBiochem) a la concentración final de 10 μ M como control positivo. Se usaron pocillos que contenían 10 μ l del medio como control negativo. La placa se incubó a 37 °C bajo 5 % de CO₂ durante 15 minutos. Después de añadir alícuotas de 10 μ l de 100 μ g/ml de lipopolisacárido a todos los pocillos, excepto al control negativo, la placa se incubó a 37 °C bajo 5 % de CO₂ durante la noche.

40 La placa se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos y se recogieron los sobrenadantes. Las concentraciones de TNF α y IL-1 β se midieron usando el kit de ELISA de TNF α (enzimoinmunoanálisis de adsorción) y el kit de ELISA de IL-1 β (Jingmei Bioengineer Technology).

45 La relación de inhibición se calculó del siguiente modo:

$$\text{Ratio de inhibición (\%)} = \left(1 - \frac{C_{\text{extracto}} - C_{\text{control}}}{C_{\text{LPS}} - C_{\text{control}}} \right) \times 100$$

50 en la que C_{extracto} es la concentración de TNF α o IL-1 β en células CMSP tratadas con el extracto y LPS, C_{LPS} es la concentración de TNF α o IL-1 β en células CMSP tratadas con LPS y dexametasona, y C_{Control} es la concentración de TNF α o IL-1 β en células CMSP sin estar tratadas con LPS o el extracto.

55 Los resultados muestran que el extracto inhibió significativamente la expresión de tanto TNF α como IL-1 β .

Ensayos *in vivo*

60 Se realizaron ensayos *in vivo* para evaluar la eficacia del extracto de *Andrographis paniculata* en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino (EII).

65 Se anestesiaron ratones macho Balb/c (18-24 g) con 1 % de pentobarbital sódico a 0,05 mg/10 g. Para inducir la EII, se administraron lentamente 1,5 mg de ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS; Sigma) en etanol al 50 % a cada ratón (excepto los ratones de control de blanco) mediante un catéter. Los ratones de control de blanco solo recibieron 0,1 ml de etanol al 50 %. Los ratones se trataron con el extracto de *Andrographis paniculata* 24 horas y 2 horas antes de la administración de TNBS y diariamente durante 5 días después de la administración.

El peso corporal de cada ratón se monitorizó cada día antes y después de la administración de TNBS. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la última administración del extracto. Se extrajeron los colones y se pesaron. Además, se calculó la relación del peso del colon con respecto al peso corporal y también se monitorizó la adhesión entre el colon y otros órganos.

5 Se obtuvieron muestras de tejidos de colon localizados precisamente 2 cm por encima del canal anal, se fijaron en 10 % de fosfato tamponado, se incorporaron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina/eosina. El grado de inflamación sobre las secciones transversales microscópicas se clasificó de 0 a 4 (0: sin signos de inflamación; 1: un nivel muy bajo de inflamación; 2: un nivel bajo de infiltración de leucocitos; 3: un nivel alto de infiltración de leucocitos, una alta densidad vascular y una pared del colon engrosada; y 4: infiltraciones transmurales, pérdida de células calciformes, una alta densidad vascular y una pared del colon engrosada).

15 Los resultados muestran que cuando los ratones se trataron con 150 mg/kg de TNBS solo, tuvieron enfermedad grave caracterizada por diarrea, pérdidas de peso intensas y sostenidas, un aumento significativo de la relación de peso del colon con respecto al peso corporal y una tasa de mortalidad del 50 %. El examen macroscópico indica que el colon de cada uno de los ratones tuvo inflamación transmural en todas las capas de la pared del intestino. A diferencia, cuando los ratones se trataron con el extracto de *Andrographis paniculata* (500 mg/kg/día) antes de la inducción de EII, tuvieron una tasa de mortalidad global reducida, síndrome consuntivo menos grave, una menor relación del peso del colon con respecto al peso corporal y una menor puntuación de EII. La pared del intestino era lisa y no era adhesiva con los tejidos de alrededor.

20 En un ensayo separado, se usaron ratas Wistar macho para evaluar la eficacia del extracto de *Andrographis paniculata* en el tratamiento de EII siguiendo un procedimiento similar al descrito anteriormente. Para inducir EII, las ratas se administraron con ácido 2,4-dinitrobencenosulfónico, en lugar de TNBS.

25 Se obtuvieron resultados similares. Específicamente, las ratas tratadas con el extracto de *Andrographis paniculata* tuvieron una tasa de mortalidad reducida, síndrome consuntivo menos grave, una menor relación del peso del colon con respecto al peso corporal y una menor puntuación de EII en comparación con aquellas no tratadas con el extracto.

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Un extracto de *Andrographis paniculata* en una forma de dosificación aceptable por vía oral para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino, caracterizado porque el extracto se obtiene de la parte aérea de *A. paniculata* y contiene 2-20 % en peso de andrografólido, 1-6 % en peso de 14-desoxi-andrografólido, 1-12 % en peso de 14-desoxi-11,12-deshidrógeno-andrografólido y 1-5 % en peso de neoandrografólido.
- 10 2. El extracto para su uso según la reivindicación 1, que contiene 3-8 % en peso de andrografólido.
- 10 3. El extracto para su uso según la reivindicación 1, que contiene 3-5 % en peso de 14-desoxi-andrografólido.
- 15 4. El extracto para su uso según la reivindicación 1, que contiene 7-9 % en peso de 14-desoxi-11,12-deshidrógeno-andrografólido
- 15 5. El extracto para su uso según la reivindicación 1, que contiene 2-4 % en peso de neoandrografólido.
- 20 6. El extracto para su uso según cualquier reivindicación precedente, para su uso en un método para tratar enfermedad de Crohn.
- 20 7. El extracto para su uso según cualquiera reivindicación precedente, para su uso en un método para tratar colitis ulcerosa.
- 25 8. Una composición en una forma de dosificación aceptable por vía oral para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino que comprende una mezcla de (i) un extracto de la parte aérea de *Andrographis paniculata* que contiene 2-20 % en peso de andrografólido, 1-6 % en peso de 14-desoxi-andrografólido, 1-12 % en peso de 14-desoxi-11,12-deshidrógeno-andrografólido y 1-5 % en peso de neoandrografólido; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 9. La composición para su uso según la reivindicación 8, en la que la forma de dosificación aceptable por vía oral es un comprimido, una cápsula, una emulsión, una suspensión acuosa, una dispersión o una disolución.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65