

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 181**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/52** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2007** **E 07729598 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 2040727**

54 Título: **Extracto aislado de nueces, procedimiento para su obtención y su utilización**

30 Prioridad:

**02.06.2006 ES 200601542**

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

**05.08.2016**

73 Titular/es:

**HARTINGTON BUSINESS, S. (100.0%)**  
**Torre Mapfre, Villa Olimpica, C. Marina 16-18 30ª C**  
**08005 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**MTCHEDLIDZE, VAKHTANG**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 579 181 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Extracto aislado de nueces, procedimiento para su obtención y su utilización

5 **Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere a un extracto aislado de nueces de elevada eficacia y estabilidad en el tiempo útil para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades víricas, fúngicas y bacterianas.

10

**[0002]** La presente invención también se refiere a un procedimiento para la obtención de dicho extracto aislado de nueces.

**Antecedentes de la invención**

15

**[0003]** Los extractos y cataplasmas de nueces se han utilizado durante muchos años en medicamentos dietéticos populares.

**[0004]** El Nogal contiene en la corteza, hojas o frutos taninos gálicos y catéquicos, juglona, juglandina, caroteno, inositol, pirogalol, vitamina C y otras sustancias.

20

**[0005]** Se ha demostrado que la corteza de nogal (Manchurian) contiene principalmente 5-hidroxi-1,4-naftoquinonas (juglona), 1,4,5-trihidroxinaftalenos (hidrojuglona), glicósidos de hidrojuglona, glicósidos de hidroxi- $\alpha$ -tetralona y derivados gálicos de estos glicósidos. También se sabe que el concho de la nuez es muy rico en vitamina C y que en las hojas se ha encontrado betacaroteno, B1, B2 y B6.

25

**[0006]** La juglona se considera un producto natural que tiene acción antimicrobiana, antineoplásica y antiparasitaria y posee propiedades antifúngicas y antisépticas. Así, se puede encontrar en diversos productos de consumo, que incluyen composiciones colorantes para el cabello y aceite de nueces satín. La juglona, preparada a partir del concho de nuez, es un ingrediente activo en complementos dietéticos.

30

**[0007]** Existen evidencias que sugieren que la juglona es un agente potente quimioterápico o quimiopreventivo. El Programa de desarrollo terapéutico, Instituto Nacional del Cáncer (NCI) evaluó la juglona en su búsqueda para el HIV-1.

35

**[0008]** La patente americana US 6.296.838, de octubre del 2001, se refiere a una composición antifúngica, de aplicación tópica, para el tratamiento y prevención de las uñas de humanos infectadas por hongos. En particular, la patente US 6.296.838 describe que el extracto con efectos sinérgicos contiene una mezcla de 10-15% de extracto de juglona a partir de concho de nuez con 20-30% de raíces trituradas de *Nardostachys jatamansi* o *Vetiveria zizanioides* o *Catharanthus roseus*, ya que un extracto de únicamente juglona demostró muy poca eficacia incluso en el tratamiento prolongado de curado y efecto fungitóxico.

40

**[0009]** Para la obtención de dicho extracto se separaron los conchos de nuez, se lavaron con agua y se dejaron secar al aire. A continuación, se trituraron y se llevó a cabo una extracción de juglona con disolventes seleccionados entre acetona, alcohol y butanol. El extracto se dejó libre de disolvente y se enfrió para eliminar las ceras de manera que la juglona se fraccionó parcialmente.

45

**[0010]** Así, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO2006/060582 se describe un procedimiento para la extracción etanólica de juglona a partir de nueces (*Juglans regia*) con un tiempo de extracción de 10 minutos a 48 horas. De acuerdo con las enseñanzas de WO2006/060582 es preferible un largo tiempo de extracción.

50

**[0011]** WO01/53418 describe un procedimiento para la extracción de nueces inmaduras con agua durante al menos 30 minutos que tiene estabilidad mejorada.

**[0012]** DE3637826 describe un procedimiento para la extracción de CO<sub>2</sub> de nueces que tiene estabilidad mejorada. De acuerdo con DE3637826 la inestabilidad está ligada con la extracción oleosa de nueces.

55

**[0013]** JP10203967 y Matsumoto M et al. "Selective nonpeptidic inhibitors of herpes simplex virus type 1 and human cytomegalovirus procesos". Boletín Biológico y Farmacéutico 2001 JP, vol.24, nº 3, 2001, páginas 236-241, XP002472659, SIN:0918-6158 describe la actividad antivírica (Herpes) de la juglona y compuestos relacionados.

60

**[0014]** Los extractos aislados de nuez descritos en el estado de la técnica se basan en la extracción de determinados ingredientes activos con finalidad antifúngica, antimicrobiana o antivírica, a partir de la parte del árbol cuyo ingrediente activo se encuentra en presencia mayoritaria.

[0015] Existen pues composiciones antifúngicas que contienen extracto de juglona a partir de concho de nuez o composiciones con elevada concentración de vitamina C obtenidas a partir de los tejidos, hojas del nogal, muy ricas en vitamina C, entre algunas de las más conocidas.

5 [0016] Las composiciones que comprenden extractos aislados de nueces presentan el inconveniente de tenerse que administrar inmediatamente después de su preparación, teniendo dichas composiciones una vida corta debido a la disminución de su efectividad con el paso del tiempo.

[0017] Por lo tanto, debido a la baja estabilidad de los extractos aislados de nueces, las composiciones que los  
10 contienen deben de fabricarse y administrarse en pocos días con el fin de proporcionar una eficacia adecuada en el tratamiento.

[0018] Así, dichas composiciones a base de extractos aislados de nuez tienen una aplicación limitada en el tiempo, debido a la baja estabilidad de la juglona en el extracto, y son de carácter exclusivamente antifúngico, antimicrobiano  
15 o antivírico.

[0019] Por lo tanto, no existe todavía un extracto aislado a partir de sólo nueces que sea estable en el tiempo e independiente del momento de su preparación. Tampoco existe todavía una composición que lo contenga que presente una aplicación simultánea antifúngica, antimicrobiana y antivírica, cuyas propiedades se mantengan  
20 estables en el tiempo.

### Descripción de la presente invención

[0020] Un primer aspecto de la presente invención es, pues, proporcionar un extracto aislado a base de nueces que  
25 sea estable en el tiempo e independiente del momento en que se realizó su preparación.

[0021] Un segundo aspecto de la presente invención es proporcionar un extracto aislado a base de nueces que además sea eficaz de manera simultánea en el tratamiento de hongos, bacterias y virus.

30 [0022] Un tercer aspecto de la invención es proporcionar un procedimiento que permita la obtención de un extracto aislado de nueces según el primer y el segundo aspecto de la invención.

[0023] Un cuarto aspecto de la presente invención es la utilización de un extracto según el primer aspecto de la presente invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades víricas,  
35 fúngicas y bacterianas.

[0024] Un quinto aspecto de la invención es proporcionar una composición que comprenda un extracto según el primer aspecto de la invención para utilizar en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades víricas, fúngicas y bacterianas.  
40

### Definiciones

[0025] En la presente invención por "frutas inmaduras de nueces" se entiende que dichas nueces están en un estado de madurez Láctico-Céreo. En general dicho estado de madurez tiene lugar entre fechas de 10 de junio  
45 hasta 15 de septiembre, más aproximadamente entre 10 de julio y 10 de agosto, aunque dichas fechas pueden variar algo en función del clima del lugar donde madura el fruto.

### Figuras

50 [0026]

La figura 1 muestra un diagrama de flujo del procedimiento según la presente invención donde se lleva a cabo la obtención de un extracto de nueces con un tiempo de extracción inferior a 10 min.

55 La figura 2 se refiere a una representación gráfica del contenido de juglona en (%) en un extracto de nueces respecto al tiempo desde su preparación, en función del tiempo empleado durante la etapa de extracción. A partir de dicha figura 2 puede observarse que el contenido de juglona se mantuvo estable en el tiempo únicamente cuando el tiempo de extracción fue inferior a 10 min. (-■-).

### 60 Descripción detallada de la invención

[0027] Los autores de la presente invención han encontrado que el tiempo de extracción empleado durante la obtención de un extracto de nueces es una condición determinante en las propiedades finales del extracto obtenido.

65 [0028] Ventajosamente, el extracto aislado de nueces de acuerdo con el primer aspecto de la invención presenta propiedades para una aplicación antifúngica, antimicrobiana y antivírica simultánea que es estable en el tiempo.

**[0029]** De acuerdo con los tres primeros aspectos de la invención se proporciona un extracto aislado de nueces que se caracteriza por el hecho de que se ha obtenido a partir de un procedimiento que comprende:

- 5 i) Recogida de frutas inmaduras de nueces como materia prima;
- ii) Preparación de la materia prima para la extracción;
- iii) Congelación de la materia prima preparada en la etapa anterior;
- iv) Secado;
- 10 v) Extracción en un tiempo inferior a 10 minutos, en donde la etapa de extracción v) comprende romper la masa seca obtenida en la etapa de secado en trozos pequeños y añadir alcohol etílico (96%) en una relación 1/2 a 1/5 peso/volumen y llevar a cabo una extracción durante un tiempo inferior a 10 minutos;
- vi) Filtración; y
- vii) Envasado final.

15 **[0030]** En particular, la preparación de la materia prima para la extracción (ii) comprende preferiblemente una limpieza mecánica, un lavado con agua corriente, un lavado con agua destilada y secado al aire.

**[0031]** Preferiblemente, la etapa de congelación (iii) comprende mantener las frutas de nueces en cámara congelada a una temperatura comprendida entre  $-18$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 70-170 horas, todavía más preferiblemente durante 20 aproximadamente  $120 \pm 5$  horas.

**[0032]** En particular, la etapa de secado iv) comprende, primero, pelar las conchas de la nuez congelada, en capas finas de 2 a 3 mm y, a continuación, ponerlas en bandejas para dejarlas secar, preferiblemente al sol y después en cámara secadora a una temperatura  $38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta obtener una humedad inferior al 10%.

25 **[0033]** La etapa de extracción (v) comprende romper la masa seca obtenida, en la etapa de secado, en trozos pequeños y añadir alcohol etílico (96%) en una relación 1/2 a 1/5 peso/volumen, preferiblemente de 1/3, y llevar a cabo una extracción durante un tiempo inferior a 10 min., preferiblemente inferior a 5 min., todavía más preferiblemente inferior a 2 min.

30 **[0034]** La etapa de filtración del extracto se lleva a cabo preferiblemente en un filtro de depuración primaria y, a continuación, en un filtro bactericida de poro fino a  $0,25 \pm 0,005$  MPa de presión.

35 **[0035]** Queda igualmente dentro del alcance de la presente invención aquellas modificaciones que pueda realizar un conocedor de la materia en las etapas i)-iv), vi) y vii), siempre que por ello no se aparte del concepto inventivo objeto de la presente invención. A título de esquema no limitativo de la invención del procedimiento definido más arriba véase figura 1.

40 **[0036]** Los autores de la presente invención han encontrado que el tiempo de extracción es clave en las propiedades finales del extracto aislado de nueces. Se cree que al aumentar el tiempo de extracción se extraen otros componentes de la nuez que posiblemente interfieren en la estabilidad y eficacia en el tiempo del extracto obtenido.

45 **[0037]** Sorprendentemente, los autores de la presente invención han encontrado que el extracto aislado de nueces obtenido según el primer aspecto de la invención mantiene sus propiedades para una aplicación antifúngica, antimicrobiana y antivírica simultánea además de ser estable en el tiempo.

**[0038]** Por lo tanto, la invención también proporciona un procedimiento para la obtención de un extracto aislado de nueces tal y como se ha definido más arriba según el primer aspecto de la invención.

50 **[0039]** Los autores de la presente invención evaluaron la estabilidad de la juglona en función del tiempo empleado durante la etapa de extracción v).

**[0040]** En la tabla 1 que sigue puede observarse que a mayor tiempo de extracción empleado en la etapa v) menor estabilidad en el tiempo del ingrediente activo juglona.

55

**TABLA 1**

Nº ensayo	Tiempo (h) extracción	Meses							
		0	15 días	1	3	6	12	18	24
1	<10 min	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
2	1	0,4	0,08	0,03	0	0	0	0	0
3	3	0,5	0,06	0,02	0	0	0	0	0
4	12	0,5	0,05	0,01	0	0	0	0	0
5	24	0,5	0,09	0,03	0	0	0	0	0

**[0041]** A partir de los resultados mostrados en la Tabla 1, puede observarse que el contenido de juglona en el extracto final disminuyó al aumentar el tiempo de extracción de la etapa v) y también disminuyó la estabilidad del extracto de juglona en el tiempo después de su preparación.

5 **[0042]** Sorprendentemente, el extracto de juglona obtenido empleando un tiempo de extracción inferior a 10 min se mantuvo estable después de su preparación durante un tiempo de hasta 24 meses y, por lo tanto, su eficacia no dependió de tiempo desde su preparación sino del tiempo empleado durante la etapa de extracción, véase ensayo N° 1 y figura 2.

10 **[0043]** Ventajosamente, con el extracto aislado de juglona según el primer aspecto de la presente invención se obtiene un extracto con una estabilidad de más de dos años, estabilidad sustancialmente superior comparada con los extractos de nueces descritos en el estado de la técnica de sólo aproximadamente unos días.

15 **[0044]** El extracto aislado de nueces según la presente invención tiene aplicación en el tratamiento del herpes, varicela, hongos en la piel, uñas, etc., en general en el tratamiento de enfermedades de la piel.

20 **[0045]** La administración del extracto según la presente invención puede hacerse por vía tópica, intraperitoneal u oral tal como, por ejemplo, en forma líquida, de cremas o comprimidos aunque otras vías de aplicación del extracto según la presente invención también forman parte del alcance de la misma.

25 **[0046]** Los autores de la presente invención también estudiaron la eficacia del extracto aislado según el primer aspecto de la invención en bacterias, hongos y virus de los ensayos N° 1 a 5 (Tabla 1). Véase Tabla 2 de a continuación.

**TABLA 2**

Meses	Tipo	Tiempo de extracción				
		<10 min (N° 1)	1 h (N°2)	3 h (N°3)	12 h (N°4)	24 h (N°5)
0	Staphylococcus ATCC 6538	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Aspergillus niger ATCC 16404	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Candida albicans ATCC 10231	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Herpes simples virus tipo 1 HSV-1	(+*)	(+*)	(+*)	(+*)	(+*)
6	Staphylococcus ATCC 6538	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Aspergillus niger ATCC 16404	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Candida albicans ATCC 10231	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Herpes simples virus tipo 1 HSV-1	(+*)	(-*)	(-*)	(-*)	(-*)
12	Staphylococcus ATCC 6538	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Aspergillus niger ATCC 16404	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Candida albicans ATCC 10231	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Herpes simples virus tipo 1 HSV-1	(+*)	(-*)	(-*)	(-*)	(-*)

(continuación)

24	<b>Staphylococcus ATCC 6538</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	<b>Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	<b>Aspergillus niger ATCC 16404</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	<b>Candida albicans ATCC 10231</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	<b>Herpes simples virus tipo 1 HSV-1</b>	(+*)	(-*)	(-*)	(-*)	(-*)

Pie de Tabla:

**(+)** Deprime Crecimiento;**(-)** No Deprime Crecimiento;

- 5 **(+\*)** Deprime Reproducción del virus HSV-1 en cultivos celulares de DR (sarcoma óseo) y de fibroblastos musculocutáneos humanos;
- (-\*)** No Deprime Reproducción del virus HSV-1 en cultivos celulares de DR (sarcoma óseo) y de fibroblastos musculocutáneos humanos;

- 10 **[0047]** A partir de los datos mostrados en la tabla anterior puede observarse que a medida que se aumentó el tiempo de extracción, el extracto perdió eficacia en el tiempo desde su fabricación.

- [0048]** Los resultados mostrados demuestran que el extracto aislado de nueces de acuerdo con el primer aspecto de la invención mantiene su eficacia en el tiempo en bacterias, hongos y virus de hasta 24 meses desde su preparación y que dicha eficacia es función del tiempo empleado durante la etapa de extracción (ensayo N° 1).

- [0049]** Por lo tanto, de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención también se proporciona un extracto aislado de nueces cuya utilización tiene aplicación para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades víricas, fúngicas y bacterianas.

20

**[0050]** La invención también se refiere a una composición que comprenda un extracto según el primer aspecto de la invención y a su utilización para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades víricas, fúngicas y bacterianas.

- 25 **[0051]** A continuación, se incluyen estudios de citotoxicidad que demuestran que el extracto según el primer aspecto de la presente invención es adecuado para su uso en humanos.

#### ESTUDIOS DE TOXICIDAD GENERAL

- 30 **[0052]** La evaluación toxicológica del extracto aislado de nueces de acuerdo con el primer aspecto (en adelante, el extracto) se realizó en ratas y ratones a los que se administró intragástricamente diferentes concentraciones del extracto. Se propuso la administración intragástrica a fin de conseguir un efecto sistémico sobre el virus del herpes, tanto en casos de infección aguda, como en portadores del virus. El extracto se puede considerar, pues, un remedio antivírico quimioterapéutico natural. Cabía esperar, no obstante, la manifestación de sus propiedades tóxicas al ser
- 35 administrado por absorción sistémica, lo que también se ha confirmado en un estudio subagudo con ratas y ratones. Conviene destacar, sin embargo, que la frecuencia de desenlaces fatales, incluso al administrar intragástricamente dosis máximas, es tan baja que resulta imposible establecer unas dosis letales medias (LD<sub>50</sub>, etc.). El extracto no posee la propiedad de acumulación material ni un efecto mutagénico sobre células de médula ósea.

- 40 **[0053]** De las propiedades tóxicas generales, es necesario señalar el efecto sobre el SNC y la acción inhibitoria sobre el crecimiento de la masa corporal en crías de animales. La toxicidad en relación con los órganos parenquimatosos consiste, en particular, en el deterioro de las células parenquimatosas del hígado y en la alteración de la función excretora de los riñones. La reducción de la masa del bazo y las suprarrenales, al parecer, refleja el estado de estrés como resultado de las prolongadas manipulaciones a lo largo de 30 días (véase la tabla 1.1, etanol
- 45 5%).

- [0054]** Asimismo, se ha establecido la dosis de extracto que provoca unas desviaciones mínimas de los índices normales en ratas, y ésta ha sido tomada convencionalmente como la dosis máxima tolerable administrando 0,5 ml de solución al 0.5% durante 30 días. En humanos, esto equivale a 250-500ml de solución a dicha concentración. En
- 50 la realidad, como es sabido, en condiciones clínicas se ensayan 1/100- 1/10 de la dosis tóxica mínima o "inactiva", lo que representa 2,5-5,0 ml de solución al 0,5% al día.

- [0055]** En conclusión, los resultados de la evaluación toxicológica de las soluciones de Ext a diferentes concentraciones aplicadas cutáneamente múltiples veces muestran que el preparado a una dosis de 0,2 ml de
- 55 solución al 5% no provoca unos efectos de intoxicación evidentes. No obstante, histológicamente, se observa una

cierta intensificación del proceso de queratinización en la epidermis sin un aumento de las capas de células epidérmicas y sin efectos inflamatorios en la piel propiamente dicha (la dermis).

5 **[0056]** La solución de extracto al 50% provoca hiperqueratosis manifiesta, sequedad y endurecimiento de los pliegues cutáneos. Histológicamente, junto con la intensificación del proceso de queratinización, se produce un incremento de las capas celulares en la epidermis, si bien en este caso tampoco se observan efectos inflamatorios. Con esta dosis tampoco se observan signos de toxicidad sistémica (por absorción).

10 **[0057]** En un experimento de dos semanas de duración con ratones, los animales recibieron volúmenes unas 4 veces mayores de las soluciones a las mismas concentraciones (soluciones al 5 y 50%). La reacción cutánea visual en forma de descamación y engrosamiento de los pliegues cutáneos, confirmada histológicamente, sin efectos inflamatorios, se observa ya al utilizar Ext al 5%. También se observa reacción granulocitopoyética, manifestada en la transformación del tipo "linfocitario" de hemopoyesis, característico de los roedores, al "granulocitario". El preparado a una concentración del 5% no provocó ningún cambio de tipo destructivo o inflamatorio en la membrana mucosa del segmento distal del recto. A esta dosis tampoco se observan síntomas de un efecto tóxico general sistémico. La aplicación sobre la piel de extracto a una concentración extremadamente alta (50%) se acompaña de efectos de toxicidad sistémica. Se observan también las propiedades características del preparado, específicamente, estimulación de la queratinización y la granulocitopoyesis (granulocitosis) sin efectos inflamatorios en la piel y la membrana mucosa.

20 **[0058]** Al simular una absorción transdérmica intensa del preparado, utilizando un método subcutáneo de administración, el signo más característico de efecto sistémico es la neurotoxicidad con prevalencia de fenómenos de depresión del SNC.

25 **[0059]** Tomando como base la determinación de las dosis tóxicas medias y otras en ratones ( $TD_{50}$ - 0,4 ml de solución al  $17 \pm 3.8$  %,  $TD_{16}$  – 0,4 ml de solución al 10 %,  $TD_{84}$  – 0,4 ml de solución al 35% en animales), como dosis no tóxica aproximada en condiciones de aplicación cutánea local en ratas se toma la dosis de 1,0-1,5 ml/Kg de solución al 5%.

30 **[0060]** Las soluciones de extracto a una concentración de 5-50% no poseen propiedades irritantes locales ni sensibilizantes (alergizantes) al ser aplicadas cutáneamente.

#### ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTIVÍRICA

35 **[0061]** El objetivo del presente estudio era examinar el extracto aislado de nueces de acuerdo con el primer aspecto utilizado en la fabricación de un preparado (en adelante, el extracto) a fin de comprobar la existencia de actividad antivírica (antiherpética) en cultivos celulares. Como modelo experimental se utilizaron las siguientes células: línea celular continua DR de sarcoma óseo (obtenida al laboratorio de virología del Centro nacional de Georgia de infecciones especialmente peligrosas) y cultivo primario de fibroblastos humanos de origen musculocutáneo (material abortivo, del instituto de obstetricia, ginecología y medicina perinatal del Ministerio de Sanidad de Georgia).

40 Material vírico – virus del herpes simple tipo I, obtenido del museo del laboratorio de virología del Instituto de preparados víricos del Ministerio de Sanidad de la Federación Rusa (Moscú).

45 **[0062]** Para la realización del experimento se utilizó el método de valoración cruzada, el cual contempla el análisis simultáneo de diferentes concentraciones del extracto (de 1:5 a 1:80) y de diferentes diluciones del virus (de 1:10 a 1:10.000.000; tradicionalmente se designa del modo siguiente: de (menos)1,0 lg a -7,0 lg). Este método permite poner de manifiesto los matices más pequeños de la interacción de los antedichos preparados y las dosis, así como también mostrar una variante óptima de protección máxima de las células contra la infección vírica (Zdrodovski P.F., Sokolov M.I. – Rukovodstvo po laboratornoy diagnostike virusnikh i rickettsioznikh bolezney [Manual de diagnóstico

50 analítico de enfermedades víricas y rickettsianas// M., "Meditsina", 1965, c396).

**[0063]** El análisis de los resultados obtenidos permitió concluir unívocamente que el extracto vegetal utilizado para la fabricación del preparado era capaz de provocar la inhibición de la reproducción del virus del herpes simple en cultivos celulares de DR (sarcoma óseo) y fibroblastos humanos musculocutáneos. Este efecto era más intenso al

55 utilizar el extracto en una dilución del 1:5 (el extracto puro no se ensayó intencionadamente ante la posibilidad de su efecto citotóxico sobre las células). El método de valoración cruzada del extracto y del virus en cultivos celulares permitió demostrar el efecto antiherpético protector del extracto y descubrir algunas regularidades del curso de la infección en las células.

#### 60 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTIHERPICA

**[0064]** En estudios in vitro, el extracto aislado de nueces de acuerdo con el primer aspecto (en adelante, el extracto) demostró poseer propiedades protectoras frente al virus del herpes simple (VES) en cultivos celulares de fibroblastos humanos y sarcoma óseo DR, por lo que se consideró necesario estudiar el efecto antivírico del extracto

65 en ratones blancos.

**[0065]** Para ello, utilizando un modelo de infección herpética en ratones blancos, se estudió la mortalidad de los animales y los índices de reproducción del virus. El estado del sistema inmunitario del organismo se evaluó en términos de producción de anticuerpos, fagocitosis y actividad del interferón. También se analizó el efecto embriotóxico y mutagénico del virus del herpes y el estado de la protección antioxidante en hembras de ratón 5 preñadas. Todos estos parámetros se estudiaron en ratones infectados tratados con el extracto.

**[0066]** En conclusión, los estudios demostraron de forma convincente que el extracto podía utilizarse con éxito para la neutralización selectiva del efecto inmunodepresor del virus del herpes. Podemos argumentar los distintos mecanismos de las propiedades del extracto que hemos indicado, pero los más aceptables son los siguientes: en 10 presencia del virus del herpes, en el organismo se genera un desequilibrio hormonal, se desarrolla una hipoxia general y celular y los procesos destructivos llevan a una intoxicación. Todos estos fenómenos se originan bien a partir de una inmunopatología ya existente o son ellos mismos los que provocan. Dicho de otro modo, en presencia de un virus del herpes, como mínimo se produce la totalidad de los cuatro factores indicados: desequilibrio hormonal, hipoxia, intoxicación e inmunopatología, con los efectos mutuamente agravantes.

15 **[0067]** Uno de los mecanismos del efecto protector del extracto son sus propiedades antioxidantes, las cuales favorecen el restablecimiento de la respiración a nivel intracelular (incluidos los inmunocitos). Se cree que el extracto produce estos efectos por medio de las sustancias activas fisiológicas que contiene (antibiótico, Juglona y flavonoides; microelementos; complejo de vitaminas C, E, PP), las cuales favorecen la intensificación de la actividad 20 funcional de las células inmunocompetentes.

**[0068]** Por ello, el extracto se puede catalogar sin ningún género de duda entre los remedios naturales activos que pueden ser utilizados eficazmente en la prevención y el tratamiento de las infecciones víricas y bacterianas, las enfermedades piogénicas e inflamatorias, así como otros estados patológicos que requieran una mejora de los 25 procesos metabólicos y adaptativos.



**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la obtención de un extracto aislado de nueces, **caracterizado** por el hecho de que comprende:
- 5
- i) Recogida de frutas inmaduras de nueces como materia prima;
  - ii) Preparación de la materia prima para la extracción;
  - iii) Congelación de la materia prima preparada en la etapa anterior;
  - iv) Secado;
  - 10 v) Extracción en un tiempo inferior a 10 minutos, en donde la etapa de extracción v) comprende romper la masa seca obtenida en la etapa de secado en trozos pequeños y añadir alcohol etílico (96%) en una relación 1/2 a 1/5 peso/volumen y llevar a cabo una extracción durante un tiempo inferior a 10 minutos;
  - 15 vi) Filtración; y
  - vii) Envasado final.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la preparación de la materia prima para la extracción (ii) comprende una limpieza mecánica, un lavado con agua y secado al aire.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la etapa de congelación (iii) comprende mantener las de nueces en cámara congelada a una temperatura comprendida entre -18 y -20°C durante 70-170 horas.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la etapa de secado iv) comprende primero pelar las conchas de la nuez congelada, en capas finas de 2 a 3 mm, y, a continuación, secar hasta obtener una humedad inferior al 10%.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho alcohol es alcohol etílico (96%).
6. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el alcohol está en una relación de 1/3 peso/volumen.
- 30 7. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el tiempo de extracción es inferior a 5 min.
8. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el tiempo de extracción es inferior a 2 min.
9. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la etapa de filtración del extracto se lleva a cabo en un filtro de depuración primaria y, a continuación, en un filtro bactericida de poro fino.
- 35 10. Composición que comprende un extracto aislado de nueces obtenido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para utilizar como medicamento.
- 40 11. Extracto aislado obtenido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para utilizar como medicamento para el tratamiento de enfermedades bacterianas, fúngicas y virales.
12. Extracto aislado según la reivindicación 11 para utilizar en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de herpes, varicela y hongos de piel o uñas.
- 45 13. Extracto aislado de nueces obtenido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que es simultáneamente eficaz en el tratamiento de hongos, bacterias y virus.

- . -

FIG 1

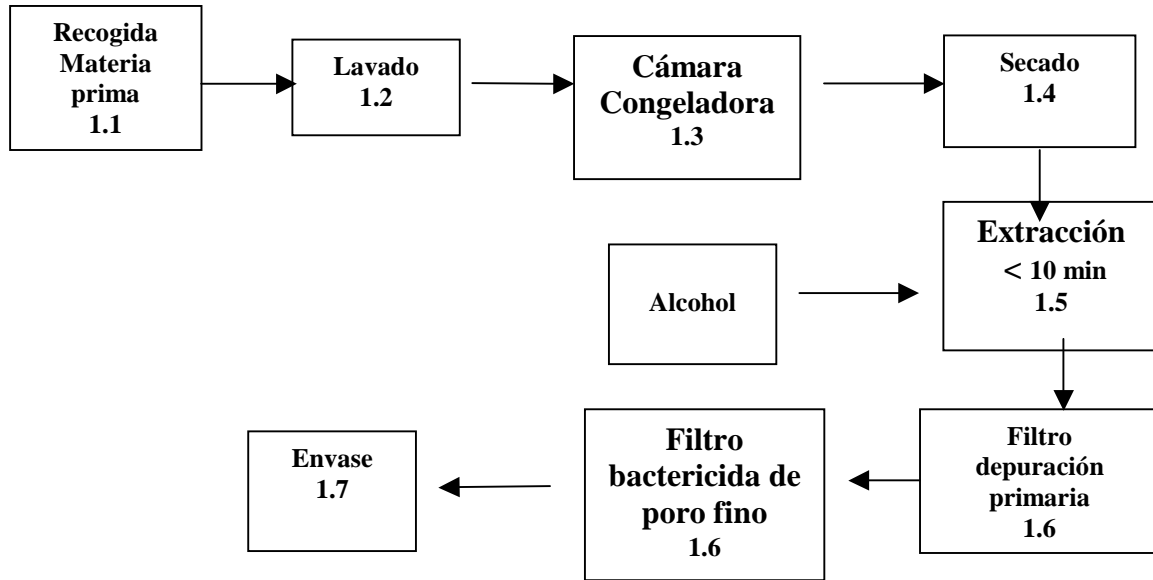


FIG 2

Estabilidad del Extracto

