

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 848**

51 Int. Cl.:

A61K 36/28 (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2007 PCT/US2007/062498**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2007 WO 2007/098471**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2007 E 07757276 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 1991242**

54 Título: **Ingredientes activos de matricaria (tanacetum parthenium) libres de partenolida y proceso para su producción**

30 Prioridad:

21.02.2006 US 775257 P

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

20.07.2017

73 Titular/es:

**ISP INVESTMENT INC (100.0%)
1011 Centre Road, Suite 315
Wilmington, DE 19805, US**

72 Inventor/es:

KOGANOV, MICHAEL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 625 848 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

Ingredientes activos de matricaria (*tanacetum parthenium*) libres de partenolida y proceso para su producción

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con un método para elaborar ingredientes bioactivos que incluyen fracciones bioactivas aisladas derivadas de jugo celular de biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*). Las fracciones bioactivas son ya sea libres de o sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas (por ejemplo, partenolida) y tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante. La solicitud divulga métodos para elaborar los ingredientes bioactivos y una composición bioactiva que incluye una mezcla de una o más de las fracciones bioactivas aisladas.

Antecedentes de la invención

10 La *Tanacetum parthenium* L. Schulz-Bip. (sin. *Chrysanthemum parthenium*, *Leicanthemum parthenium*, *Matricaria parthenium*, *Pyrethrum parthenium*) es una planta que pertenece a la familia Compositae (Asteraceae, *Matricaria* o margarita). La *Tanacetum parthenium* se conoce bajo los siguientes nombres comunes: altamisa, amargosa, aciano, gamaza, gamazón, plantas febrífugas, matricaria, chapote, camomila grande, manzanilla, matricaria, margarita de verano, madrehuella, Santa María, y varadika. De estos nombres comunes, el nombre "matricaria" se utiliza con mayor
15 frecuencia.

La matricaria es una planta perenne corta que crece 15-80 cm de altura. Los tallos crecen verticales hacia arriba y son surcados y peludos. Las hojas son hojas verdes plumosas divididas dobles tienen márgenes serrados. La flor tiene pétalos con rayas blancas y un centro de color amarillo que es plano. El olor de la planta cuando se aplasta es fuerte, aromático, y amargo. La matricaria se ha cultivado durante por lo menos 2.000 años y es oriunda de la península de los
20 Balcanes y las montañas del Cáucaso. En la actualidad, la matricaria crece en Europa, América del Norte, América del Sur, África del Norte, China, Japón y Australia. Las condiciones óptimas para el cultivo de matricaria son: suelo bien drenado que tiene un pH = 6.0... 6.7 (pH óptimo = 6.3); pleno sol o sombra parcial; adecuado para resistir en zonas de temperatura USDA de nueve a cinco sin protección. El mejor clima para la matricaria es zonas de cinco y siete. Con protección se puede cultivar la matricaria en las zonas tres y cuatro, aunque en un clima continental (por ejemplo, Kansas, EE.UU., Saskatchewan, Canadá) la matricaria a veces se considera una planta anual.

Los antiguos griegos y primeros europeos utilizaron la Matricaria para tratar la fiebre, inflamación e hinchazón, así como para repeler insectos y para tratar mordeduras y picaduras. En los últimos 20 años, la matricaria ha suscitado un gran interés para el tratamiento de migrañas, artritis y enfermedades inflamatorias. Las partes de la planta que se utilizan son
30 hojas secas o frescas y partes aéreas de la floración. La matricaria se utiliza en forma de una hierba cruda, polvo seco, hoja fresca, cápsula de hoja secada por congelación, cápsula de hoja seca, cápsula de gelatina blanda, tintura, infusión (por ejemplo, té), extractos, e ingredientes de bebidas funcionales. Aparentemente, la planta entera de matricaria actúa de una manera similar a los agentes antiinflamatorios no esteroides. Sin embargo, los extractos de matricaria actúan bastante similares a la cortisona (véase, por ejemplo, Feverfew. Botanical Monograph, American Journal of Natural Medicine 4(6):28-29 (1997)).

35 Dichas actividades de discrepancia y de amplio espectro atraen la atención e investigación de los ingredientes activos de la planta y sus derivados. Los principales productos químicos activos conocidos en la matricaria son lactonas sesquiterpénicas (contenido total $\leq 1.8\%$) y aceites esenciales (contenido total de $\leq 0.07\%$). La lista de los compuestos activos de matricaria incluyen los siguientes: (i) lactonas sesquiterpénicas (que incluyen artecanina, canina, 10-epicanina, crisantemolida, crisantemonina, epoxiartemorina, 1 β -hidroxiarbusculina, 3 β -hidroxipartenolida, 8 β -hidroxireinosina, magnoliolida, partenolida, reinosina, santamarina, seco-tanapartenolida A, tanapartina, tanapatina-1 α , 4 α -epóxido, tanapartina-1 β ,4 β -epóxido); (ii) sesquiterpenos (que incluyen alcanfor, β -farneseno, y germacreno); (iii) monoterpenos; (iv) flavonoles (que incluyen tanetina, kaempferoles, quercetageninas, apigenina, luteolina, y criseroitol);
40 y (v) poliinas éter espiroacetálico enol.

El grupo más abundante de estos compuestos es un grupo de γ -lactonas α -insaturadas; particularmente, partenolida, que representa ~85% de γ -lactonas α -insaturadas. La partenolida, que aparentemente es ubica en células de la superficie de la hoja de matricaria es la más conocida y bien estudiada (véase, por ejemplo, Smith et al., J. Chromatogr., 627:255 (1992); y Smith, R.M., LC GC Int., (Jan. 8-15, 1996)). Las γ -lactonas α -insaturadas, que incluyen partenolida, se consideran que son los ingredientes fundamentales responsables de las actividades biológicas de la matricaria, pero son también los mismos ingredientes a menudo responsables de reacciones alérgicas provocadas por los derivados de
45 matricaria.

Por ejemplo, las preparaciones de matricaria utilizados en los ensayos clínicos exitosos tenían un contenido de partenólida de 0.4% a 0.66%, que supera las concentraciones capaces de iniciar ulceración, dermatitis exudativa, y efectos patológicos que surgen del contacto externo (véase, por ejemplo, Awang, D.V.C., "Feverfew," Can. Pharm. J., 122:266-270 (1989)). Al mismo tiempo, aproximadamente 10-18% de los usuarios de matricaria han reportado algunos

efectos adversos generalmente leves y reversibles (véase, por ejemplo, Ernst et al., "The efficacy and safety of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): una actualización de una revisión sistemática, "Public Health Nutrition, 3(4a):509-514 (2000); Porter et al., "Feverfew in Saskatchewan",

5 www.agr.gov.sk.ca/DOCS/crops/special_crops/feverfew.asp?firstPick=&secondpck=&thirdpick=Production%20Information) (2004)) y la partenolida puede ser responsable de estos efectos adversos. La capacidad de las γ -lactonas α -insaturadas (que incluyen partenolida) para activar muchas reacciones alérgicas está bien documentada (véase, por ejemplo, Arch. Dermatol. Forsch, 251(3):235-244 (1975); Arch. Dermatol. Forsch, 255(2):111-121 (1976); Contact Dermatitis, 38(4):207-208 (1988); Am. J. Contact Dermatol., 1:49-50 (1998-1999); Br. J. Dermatol, 132(4):543-547 (1995)).

10 En los últimos años, se han dirigido esfuerzos hacia la preparación de extractos de matricaria, que pretenden ser sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas y, más particularmente, sustancialmente libres de partenolida (véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 6,224,875 y Patente Estadounidense No. 6,479,080). Cabe señalar que "sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas" y "sustancialmente libre de partenolida" significa un extracto que
15 tiene un contenido en peso de γ -lactonas α -insaturada o partenolida, respectivamente, por debajo de aproximadamente 0.1%, más preferiblemente por debajo de 0.1%, más preferiblemente por debajo de aproximadamente 0.09%, y más preferiblemente por debajo de 0.07%. Debido a que los contenidos superiores son más bajos que en una fitomasa de matricaria promedio que tiene 0.4 a 1.8% de partenolida (véase, por ejemplo, Marino L., "The effect of clonal micropropagation on partenolida content in two genotypes of feverfew, *Tanacetum parthenium*," AgroFarm Technologies
20 Feverfew Report, London, Ontario (2004)), se requieren muchas etapas de extracción de complejo que utilizan diversos solventes orgánicos y purificación, incluyendo la evaporación completa de los solventes y la utilización de resina de intercambio iónico, para producir extractos que tiene contenido reducido de γ -lactonas α -insaturadas y particularmente partenolida.

Los extractos de solventes orgánicos mencionados anteriormente se obtienen de la fitomasa de matricaria seca utilizando un proceso que comprende las siguientes etapas: (a) extraer una cantidad de material vegetal de la porción
25 aérea de la planta con acetona, alcoholes o una mezcla de estos solventes con agua; (b) extraer el material de la etapa (a) con un solvente de hidrocarburo; (c) extraer la fase de no hidrocarburo restante con un solvente no polar; (d) evaporar el extracto de solvente no polar y redissolver el residuo en solución alcohólica de agua, y luego tratar el residuo se redissuelto con una resina básica fuerte; (e) eluir la resina con un alcohol y retirar la solución eluida; (f) tratar la resina con una solución alcohólica o acuosa- alcohólica de un ácido, concentrar la solución y extraer el residuo resultante con
30 un solvente no polar; (g) evaporar el solvente no polar de la etapa (f) para formar un residuo que se agrega al residuo de la evaporación del extracto de hidrocarburo de la etapa (b) y a la fase acetónica o alcohólica obtenida después de la extracción con el solvente no polar de la etapa (c); y (h) evaporar el solvente y secar el residuo restante.

Los solventes preferidos para las diversas etapas de extracción incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: para la etapa (a): acetona, metanol, etanol o mezclas de los mismos con agua; para la etapa (b): hexano, n-pentano, éter de
35 petróleo, ligroína; para la etapa (c): cloruro de metileno, cloroformo, acetato de etilo, preferiblemente cloruro de metileno; y para la etapa (f): acetato de etilo.

De acuerdo con las Patentes Estadounidenses Nos. 6,224,875 y 6,479,080, este extracto "sustancialmente libre de partenolida" tiene propiedades farmacológicas favorables junto con un riesgo reducido de inducir reacciones alérgicas. Sin embargo, el extracto anterior se aísla con tratamiento secuencial utilizando solventes orgánicos, que pertenecen a
40 cuatro grupos diferentes, y que puede tener compatibilidad limitada con muchos componentes convencionales de formulaciones para el cuidado de la piel. Por lo tanto, la aplicabilidad del extracto anterior como ingrediente para productos de cuidado de la piel tiene ciertos límites (por ejemplo, no son fácilmente solubles en agua). La Patente Estadounidense No. 2003/0175235 enseña un método para extraer fracciones bioactivas de las especies de plantas en el que el jugo de célula vegetal se extrae de la biomasa vegetal fresca al separar la fracción de membrana y el
45 sobrenadante de jugo celular utilizando tratamiento con microondas. El sobrenadante de jugo celular se procesa para separar efectivamente la fracción de citoplasma y la fracción de suero celular que se refina adicionalmente para producir un filtrado de fracción de suero que contiene los ingredientes bioactivos. En el método divulgado en la presente solicitud, un ajuste de pH y la etapa de tratamiento por microondas se realizan en el jugo celular con el fin de producir un sobrenadante de jugo celular en el que las γ -lactonas α -insaturadas se han fraccionado de plantas de matricaria.

50 Aunque el extracto de matricaria descrito es "sustancialmente libre de partenolida", no está realmente libre de material de partenolida debido al contenido de partenolida residual permitido. Las actividades específicas altas bien conocidas de partenolida en sí pueden contribuir a las propiedades farmacológicas y alergenicidad residual del extracto, especialmente cuando se utiliza en altas concentraciones. Es importante que las propiedades farmacológicas del extracto anterior sean limitadas por actividades de sólo aquellos ingredientes de matricaria que se solubilizan en ciertos
55 solventes en ciertas condiciones. Por lo tanto, dichos extractos representan sólo una parte de los componentes activos existentes en plantas de matricaria vivas. Por ejemplo, las hojas de matricaria secas por congelación y hojas secas demostraron un efecto beneficioso significativo en comparación con un placebo, pero los extractos de etanol de la matricaria fueron inefectivos (véase, por ejemplo, Ernst et al., "The efficacy and safety of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): una actualización de una revisión sistemática," Public Health Nutrition, 3(4a):509-514 (2000)).

Con respecto a la comparación de las actividades específicas que se encuentran en diferentes formas de productos de matricaria, cabe señalar que se ha demostrado que la preparación de hojas secas enteras es más efectiva que sus extractos, y, adicionalmente, los extractos de matricaria seca y fresca tienen marcadas diferencias en la potencia y perfiles farmacológicos (véase, por ejemplo, Barsby et al., "Feverfew and vascular smooth muscle: Extracts from fresh and dried plants show opposing pharmacological profiles, dependent upon sesquiterpene lactone content," *Planta Medica*, 59:20-25 (1993)). Por lo tanto, en relación y en contraste con los extractos de hoja de matricaria secos, los extractos de hojas frescas tienen: (a) corriente de potasio dependiente de voltaje con inactivación reducida de una manera relacionada con concentración; (b) inhibición dependiente de dosis de producción de leucocitos de tromboxano B₂ y leucotrieno B₄; y (c) respuesta muscular inhibida a triptamina, tromboxano, y relajación inducida por acetilcolina reducida.

Curiosamente, el fuerte deseo de maximizar la eficacia de los productos de matricaria llevó recientemente a una producción mayor de productos que contienen todos los componentes vegetales que se afectan mínimamente por el procesamiento de la planta. Entre estos productos se presentan preparaciones de hojas de matricaria secadas por congelamiento, aunque dicho material es adecuado para aplicaciones limitadas, y el cuidado de la piel no está entre ellas.

Adicionalmente, las actividades de los extractos de matricaria y el nivel de partenolida en estos extractos dependen de la selección método de extracción de solvente final (véase, por ejemplo, Kaplan, M., "Comparison of Supercritical Fluid and Solvent Extraction of Feverfew (*Tanacetum parthenium*)," *Turk J. Chem*, 26:473-480 (2002)). Por lo tanto, difieren el material extraído mediante extracción con solvente y la extracción con fluido supercrítico. Por ejemplo, los extractos de CO₂ de fluidos supercríticos tienen mayor contenido partenolida que los extractos de cloroformo, y después de eso más que los extractos de acetona.

La composición de matricaria varía significativamente, dependiendo de la fuente de material vegetal y condiciones de cultivo y cosecha. Se han encontrado variaciones enormes en la cantidad de partenolida. Por ejemplo, las plantas de crecimiento americanas contienen $\leq 50\%$ de la concentración de partenolida encontrada en la matricaria cultivada en Inglaterra y Francia. Los contenidos de partenolida fueron más altos para tierra seca en comparación con la matricaria irrigada. Se encontró que al someter la matricaria a un único evento de estrés de agua puede aumentar el contenido de partenolida (Fonseca et al., "Partenolide and abscisic acid synthesis in feverfew are associated but environmental factors affect them dissimilarly," *J. Plant Physiology*, 162,:485-494 (2005)). Las flores contenían mayores niveles de partenolida, mientras que los tallos contenían menos partenolida. El contenido de partenolida en flores aumentó y el contenido de tallos y hojas disminuyó a medida que se retardó la cosecha. La matricaria cosechada durante la tarde contenía significativamente más partenolida que las plantas cosechadas en la mañana y la exposición de la matricaria a la luz ultravioleta (UV) resultó en una disminución significativa del contenido de partenolida. Cabe señalar que la amplia variación en la cantidad de partenolida en los derivados de matricaria podría ser el resultado esencial de la interacción de dos factores principales: las condiciones de cultivo y métodos de procesamiento. Desafortunadamente, las Patentes Estadounidenses Nos. 6,224,875 y 6,479,080 no proporcionan ninguna información relativa a la reproducibilidad del extracto de matricaria "sustancialmente libre de partenolida". Sin embargo, como se describió anteriormente, una gran variabilidad de la materia prima puede tener un impacto significativo sobre las propiedades del extracto.

Por lo tanto, existen muchos factores genéticos, geográficos, climáticos y tecnológicos, que conducen a mala reproducibilidad y a menos calidad totalmente óptima de productos y extractos de matricaria convencionales (véase, por ejemplo, Hepinstall et al., "Partenolida content and bioactivity of feverfew (*Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip.). Estimation of commercial and authenticated feverfew products," *J. Pharm. Pharmacol.*, 44:391-395 (1992); Draves, A.H. and S.E. Walker, "Partenolide Content of Canadian Commercial Feverfew Preparations: Label Claims are Misleading in Most Cases," *Canadian Pharm J.*, 136(10):23-30 (Dec. 2003/Jan. 2004)) y estos factores crean serios problemas para una amplia utilización de los derivados de matricaria en la medicina natural y el cuidado de la piel.

Por lo tanto, subsiste la necesidad de un método de producción de derivados de matricaria libres de partenolida y altamente reproducibles que tengan un amplio espectro de actividades biológicas deseables, que no estén limitadas por sólo aquellas actividades que tienen afinidad a ciertos solventes, es decir, que están de otro modo no sujetas a las limitaciones de extracción química convencional.

Resumen de la invención

La solicitud divulga ingredientes bioactivos que incluyen fracciones bioactivas aisladas derivadas de jugo celular de biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*). Las fracciones bioactivas son ya sea libres de o sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas (por ejemplo, partenolida). Adicionalmente, las fracciones bioactivas tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante.

La presente invención se relaciona con un método para aislar fracciones bioactivas que se derivan de jugo celular de biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*) y que son ya sea libres de o sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas (por ejemplo, partenolida). Este método involucra proporcionar biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*). La biomasa fresca se procesa bajo condiciones efectivas para producir un

5 sobrenadante de jugo celular y una fracción de membrana. El sobrenadante de jugo celular se trata bajo condiciones efectivas para producir un primer sobrenadante de suero de jugo celular y un precipitado de fracción de citoplasma. El precipitado de fracción de citoplasma luego se aísla como una fracción bioactiva es decir por lo menos sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas. La solicitud también divulga un ingrediente bioactivo que incluye el precipitado de fracción de citoplasma producido por este método, y que tiene actividad antiinflamatoria y antioxidante.

10 La presente invención también se relaciona con un método para preparar una fracción de suero de jugo celular estabilizado que es una fracción bioactiva que se deriva de jugo celular de biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*) y es decir libre de γ -lactonas α -insaturadas (por ejemplo, partenolida). Este método implica clarificar el primer sobrenadante de suero de jugo celular bajo condiciones efectivas para producir un segundo sobrenadante de suero de jugo celular. Se mezcla un agente de estabilización con el segundo sobrenadante de suero de jugo celular bajo condiciones efectivas para producir una fracción de suero de jugo celular estabilizado. La fracción de suero de jugo celular estabilizado es una fracción bioactiva es decir libre de γ -lactonas α -insaturadas. La solicitud también divulga un ingrediente bioactivo que incluye la fracción de suero de jugo celular estabilizado producido por este método, y que tiene actividad antiinflamatoria y antioxidante.

15 La presente invención también se relaciona con un método para preparar una fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado que es una fracción bioactiva que se deriva de jugo celular de biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*) y es decir libre de γ -lactonas α -insaturadas (por ejemplo, partenolida). Este método involucra concentrar la fracción de suero de jugo celular estabilizado bajo condiciones efectivas para producir un sobrenadante de suero de jugo celular concentrado. Un agente de estabilización se mezcla con el sobrenadante de suero de jugo celular concentrado bajo condiciones efectivas para producir una fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado. La fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado es una fracción bioactiva es decir libre de γ -lactonas α -insaturadas. La solicitud también divulga un ingrediente bioactivo que incluye la fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado producida por este método, y que tiene actividad antiinflamatoria y antioxidante.

25 La solicitud divulga adicionalmente una composición bioactiva que incluye una mezcla de una o más de las fracciones bioactivas aisladas de la presente invención.

30 La presente invención es útil en que proporciona un medio para la fabricación de derivados de matricaria altamente reproducibles y libres de partenolida o sustancialmente libres de partenolida que tienen un amplio espectro de actividades biológicas deseables (por ejemplo, actividades antiinflamatorias y antioxidantes). Una ventaja de la presente invención sobre la técnica anterior es que el método de la presente invención no requiere el uso de solventes orgánicos fuertes para aislar las fracciones bioactivas de la presente invención. Los ingredientes bioactivos divulgados en la solicitud son útiles como ingredientes activos en varias aplicaciones tópicas y orales a mamíferos (que incluyen humanos). Estas formulaciones se pueden utilizar para inhibir la actividad inflamatoria en el tejido de la piel y para proteger el tejido de la piel del daño inducido por luz ultravioleta. Los ingredientes bioactivos divulgados aquí también se pueden utilizar para la normalización de trastornos de la piel en el tejido de la piel de un mamífero.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un dibujo esquemático que demuestra una realización del proceso para preparar los ingredientes bioactivos de la presente invención.

40 La Figura 2 es un cromatograma de cromatografía líquida de alta presión ("HPLC") de la biomasa fresca de matricaria utilizada en una realización del proceso de la presente invención. La flecha hacia abajo muestra el pico de partenolida.

La Figura 3 es un cromatograma de HPLC del material enriquecido con fibra aislado por una realización del proceso de la presente invención. La flecha hacia abajo muestra el pico de partenolida.

La Figura 4 es un cromatograma de HPLC del Precipitado I aislado por una realización del proceso de la presente invención. La flecha hacia abajo muestra el pico de partenolida.

45 La Figura 5 es un cromatograma de HPLC del Precipitado II (Ingrediente Bioactivo A) aislado por una realización del proceso de la presente invención. La flecha hacia abajo muestra el pico de partenolida.

La Figura 6 es un cromatograma de HPLC del Sobrenadante Final (Ingrediente Bioactivo B) aislado por una realización del proceso de la presente invención.

50 La Figura 7 es un cromatograma de HPLC del Sobrenadante Final Concentrado (Ingrediente Bioactivo C) aislado por una realización del proceso de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a ingredientes bioactivos que incluyen fracciones bioactivas aisladas derivadas de jugo celular de biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*). Las fracciones bioactivas son ya sea libres de o sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas, y más particularmente ya sea libre de o sustancialmente libre de partenolida. Como se utiliza aquí, el término "fracción bioactiva" e "ingrediente bioactivo" se pueden utilizar de forma intercambiable. En vista de la presente especificación, el experto común en la técnica sabrá cuando dicho uso intercambiable de los términos es apropiado. Los ingredientes bioactivos divulgados en la solicitud tienen actividades favorables, que incluyen, sin limitación, actividades antiinflamatorias y antioxidantes.

Como se utiliza aquí, el término "matricaria" es el nombre común de la planta "*Tanacetum parthenium*".

Como se utiliza aquí, los términos "sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas" y "sustancialmente libre de partenolida" se refieren a un ingrediente bioactivo o fracción bioactiva de matricaria que tiene un contenido en peso de γ -lactonas α -insaturadas o partenolida, respectivamente, igual a o menor de aproximadamente 0.01%, pero aún dentro del límite detectable de γ -lactonas α -insaturadas o partenolida utilizando ensayos analíticos de cromatografía líquida de alta presión estándar ("HPLC") bien conocidos en la técnica. Como se utiliza aquí, todos los porcentajes utilizados para referirse al contenido de peso o concentración de γ -lactonas α -insaturadas o partenolida en los ingredientes bioactivos/fracciones bioactivas de la presente invención, a menos que se indique lo contrario, se refieren al porcentaje en peso (comúnmente abreviado por el símbolo "% en peso" o la frase "por ciento en peso").

Como se utiliza aquí, los términos "libre de γ -lactonas α -insaturadas" y "libre de partenolida" se refieren a un ingrediente bioactivo o fracción bioactiva de matricaria que tiene un contenido en peso de γ -lactonas α -insaturadas o partenolida, respectivamente, que está por debajo del límite detectable para γ -lactonas α -insaturadas o partenolida utilizando HPLC estándar ensayos analíticos bien conocidos en la técnica. En una realización, los bioactivos fracciones ingredientes/bioactivos que están libres de partenolida tienen un contenido en peso de partenolida que es menor que 0.00007% en peso. Aquellos expertos comunes en la técnica reconocerían que los ingredientes bioactivos/fracciones bioactivas de la presente invención que son "libres de γ -lactonas α -insaturadas" o "libres de partenolida" se caracterizan como "completamente libres de γ -lactonas α -insaturadas" o "completamente libres de partenolida", respectivamente.

Un método adecuado para detectar una cantidad de partenolida se describe adicionalmente en el Ejemplo 6 (infra). En pocas palabras, dicho método para detectar partenolida implica la detección a 225 nm, donde las concentraciones de partenolida se determinan utilizando una curva de calibración de múltiples puntos desarrollada con seis estándares de partenolida (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO) que varían desde 30 μ g de partenolida/gramo de muestra a 900 μ g de partenolida/gramo de muestra. En una realización, el límite de detección de partenolida en estas condiciones es de 0.7 μ g de partenolida/mL de muestra (es decir, 0.00007%). Aproximadamente 30 μ g de partenolida/gramo de muestra (es decir, 0.003%) se pueden cuantificar utilizando este grupo de condiciones.

Un ingrediente bioactivo divulgado en la solicitud corresponde a un "precipitado de fracción de citoplasma" como se define aquí. En referencia al esquema del proceso descrito en la Figura 1, el "precipitado de fracción de citoplasma" incluye una categoría de ingrediente bioactivo a la cual pertenece el "Precipitado II 36". Adicionalmente, como se describe en la sección de Ejemplos (infra), este "precipitado de fracción de citoplasma" incluye una categoría de ingrediente bioactivo al cual pertenece el "Ingrediente Bioactivo A". Como se demuestra en los Ejemplos, se mostró que el Ingrediente Bioactivo A como se divulga aquí contenía aproximadamente 0.01% en peso de partenolida, y por lo tanto calificaría como sustancialmente libre de partenolida. También se divulga, que el ingrediente bioactivo que corresponde al "precipitado de fracción de citoplasma", puede tener un perfil de HPLC correspondiente al perfil mostrado en la Figura 5, o similares.

Otro ingrediente bioactivo divulgado en la solicitud corresponde a una "fracción de suero de jugo celular estabilizado" como se define aquí. En referencia a la sección de Ejemplos (infra) y el esquema del proceso descrito en la Figura 1, esta "fracción de suero jugo celular estabilizado" incluye una categoría de ingrediente bioactivo a la que pertenece el "Ingrediente Bioactivo B" e "Ingrediente Bioactivo B 60". Como se demuestra en los Ejemplos, se mostró que el Ingrediente Bioactivo B como se divulga aquí fue contenía por debajo de 0.00007% en peso de partenolida, y por lo tanto se define como libre de partenolida. En otras palabras, se encontró que la cantidad de partenolida en este ingrediente bioactivo está por debajo del límite de detección del procedimiento analítico utilizado para detectar partenolida (véase el Ejemplo 6, "Método para Determinación de Contenido de Partenolida"). El ingrediente bioactivo correspondiente a la "fracción de suero de jugo celular estabilizado" puede tener un perfil de HPLC correspondiente al perfil mostrado en la Figura 6, o similares. El ingrediente bioactivo es fácilmente soluble en agua.

Un ingrediente bioactivo adicional divulgado en la solicitud corresponde a una "fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado" como se define aquí. En referencia a la sección de Ejemplos (infra) y el esquema del proceso descrito en la Figura 1, este "fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado" incluye una categoría de ingrediente bioactivo a la que pertenecen el "Ingrediente Bioactivo C" e "Ingrediente Bioactivo C 80". Como se demuestra en los Ejemplos, se mostró que el Ingrediente Bioactivo C divulgado aquí contenía por debajo de 0.00007% en peso de partenolida, y por lo tanto se define como libre de partenolida. En otras palabras, se encontró que la cantidad de partenolida en este ingrediente bioactivo está por debajo del límite de detección del procedimiento analítico utilizado para detectar partenolida (véase el Ejemplo 6, infra). El ingrediente bioactivo que corresponde a la "fracción de

suero de jugo celular concentrado estabilizado” puede tener un perfil de HPLC correspondiente al perfil mostrado en la Figura 7, o similares. El ingrediente bioactivo es fácilmente soluble en agua.

La fracción bioactiva de lo divulgado en la solicitud tiene actividad antiinflamatoria y antioxidante.

5 Con respecto a la actividad antiinflamatoria, dicha actividad se puede determinar utilizando un ensayo de inhibición de elastasa (véase, por ejemplo, Ejemplo 6, “Método para Determinación de la Actividad Inhibidora de la Elastasa”). El ingrediente bioactivo divulgado aquí tiene una actividad antiinflamatoria expresada en valores de IC₅₀ que varían de aproximadamente 0.1% (v/v) a aproximadamente 2.0% (v/v), particularmente desde aproximadamente 0.3% (v/v) a aproximadamente 1.7% (v/v). Como se utiliza aquí para definir la actividad antiinflamatoria, el término “valor IC₅₀” se refiere a la concentración de ingrediente bioactivo requerida para reducir la velocidad de la reacción enzimática de la elastasa en un 50%. Como se muestra en las Tablas 4, 7, 10 y 13, la actividad antiinflamatoria (en valores IC₅₀) de los ingredientes bioactivos identificados se puede expresar en términos de volumen (por ejemplo, microlitros, µL), y luego se vuelve a calcular en términos de una concentración volumen por volumen (v/v). Los datos antiinflamatorios mostrados en las Tablas 4, 7, 10, y 13 se basan en un volumen de 3.0 mL de mezcla de reacción.

15 Con respecto a la actividad antioxidante, dicha actividad se puede determinar utilizando un ensayo de depuración de superóxidos (véase por ejemplo, Ejemplo 6, “Método para la Determinación de Actividad de Depuración de Superóxidos”). El ingrediente bioactivo divulgado aquí tiene una actividad antioxidante expresada en valores IC₅₀ que varían de aproximadamente 0.007% (v/v) y aproximadamente 1.0% (v/v), particularmente de aproximadamente 0.067% (v/v) a aproximadamente 0.27% (v/v). Como se utiliza aquí para definir la actividad antioxidante, el término “valor IC₅₀” se refiere a la concentración de ingrediente bioactivo requerida para disminuir la velocidad de la reducción del citocromo c en un 50%. Como se muestra en las Tablas 4, 7, 10 y 13, la actividad antioxidante (en valores de IC₅₀) de los ingredientes bioactivos identificados se puede expresar en términos de volumen (por ejemplo, microlitros, µl), y luego se vuelve a calcular en términos de una concentración volumen por volumen (v/v). El antioxidante mostrado en las Tablas 4, 7, 10, y 13 se basa en un volumen de 3.0 mL de mezcla de reacción.

25 El ingrediente bioactivo se pueden utilizar para aplicaciones tópicas con o sin un agente estabilizador. Los agentes estabilizadores adecuados son aquellos utilizados convencionalmente en la técnica, y pueden incluir, sin limitación, un emulsionante, un conservante, un antioxidante, una matriz polimérica, y mezclas de los mismos.

Como se utiliza aquí, “aplicación tópica” se refiere en general a las técnicas relacionadas con la colocación directamente sobre o difusión de los ingredientes bioactivos o formulaciones que contienen estos ingredientes bioactivos sobre la piel exterior, por ejemplo, mediante el uso de las manos o un aplicador tal como una toallita.

30 Los ingredientes bioactivos (y formulaciones que los contienen) son “cosméticamente aceptables”. Como se utiliza aquí, el término “cosméticamente aceptable” se refiere a ingredientes bioactivos, formulaciones, agentes cosméticamente activos, o ingredientes inertes que son adecuados para uso en contacto con tejidos de mamíferos (por ejemplo, la piel de humanos) sin excesiva toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

35 Los ingredientes bioactivos (y formulaciones que los contienen) son útiles para aplicación tópica y oral a humanos, y se pueden aplicar en una “cantidad segura y efectiva”. Como se utiliza aquí, el término “cantidad segura y efectiva” se refiere a una cantidad de ingrediente bioactivo o formulación suficiente para inducir una modificación significativamente positiva en la afección que se va a regular o tratar, pero suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves. La cantidad segura y efectiva del ingrediente bioactivo o formulación que contiene el ingrediente bioactivo variará con la afección particular que se está tratando, edad y condición física del usuario final, gravedad de la afección que se va a tratar/prevenir, duración del tratamiento, naturaleza de la terapia concurrente, ingrediente bioactivo específico o formulación empleada, el portador tópico cosméticamente aceptable particular utilizado, y factores similares.

Las formulaciones que contienen los ingredientes bioactivos divulgados aquí se pueden preparar utilizando metodología que es bien conocida por un experto en la técnica.

45 La presente invención también se relaciona con un método para aislar fracciones bioactivas que se derivan de jugo celular de biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*) y que son ya sea libres de o sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas (por ejemplo, partenolida). Este método involucra proporcionar biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*). La biomasa fresca adecuada puede incluir cualquier parte de la planta de matricaria, que incluye, por ejemplo, sus hojas, flores, brotes, tallos, y raíces. La biomasa fresca se procesa bajo condiciones efectivas para producir un sobrenadante de jugo celular y una fracción de membrana. El sobrenadante de jugo celular se trata bajo condiciones efectivas para producir un primer sobrenadante de suero de jugo celular y un precipitado de fracción de citoplasma. En una realización, el “precipitado de fracción de citoplasma” corresponde al ingrediente bioactivo A (véase Figura 1 y la sección de Ejemplos). El precipitado de fracción de citoplasma luego se aísla como una fracción bioactiva que está sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas, particularmente sustancialmente libres de partenolida.

Una realización para procesar la biomasa fresca bajo condiciones efectivas para producir el sobrenadante de jugo celular y la fracción de membrana es como sigue: (i) la biomasa fresca se separa en un componente de jugo celular y un material enriquecido con fibra; (ii) el componente de jugo celular se clarifica para producir un componente de jugo celular clarificado; y (iii) el componente de jugo celular clarificado se separa en el sobrenadante de jugo celular y la fracción de membrana.

La presente invención también se relaciona con un método para preparar una fracción de suero de jugo celular estabilizado que es una fracción bioactiva que se deriva de jugo celular de biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*) y es decir libre de γ -lactonas α -insaturadas (por ejemplo, partenolida). Este método involucra clarificar el primer sobrenadante de suero de jugo celular (descrito anteriormente) bajo condiciones efectivas para producir un segundo sobrenadante de suero de jugo celular. Un agente de estabilización (cuyos ejemplos adecuados se describen aquí) se mezcla con el segundo sobrenadante de suero de jugo celular bajo condiciones efectivas para producir una fracción de suero de jugo celular estabilizado. La fracción de suero de jugo celular estabilizado es una fracción bioactiva es decir libre de γ -lactonas α -insaturadas, y particularmente libres de partenolida. En una realización, la "fracción de suero de jugo celular estabilizado" corresponde al ingrediente bioactivo B (véase Figura 1 y la sección de Ejemplos).

La presente invención también se relaciona con un método para preparar una fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado que es una fracción bioactiva que se deriva de jugo celular de biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*) y es decir libre de γ -lactonas α -insaturadas, particularmente libres de partenolida. Este método involucra concentrar la fracción de suero de jugo celular estabilizado (descrita anteriormente) bajo condiciones efectivas para producir un sobrenadante de suero de jugo celular concentrado. Un agente de estabilización (cuyos ejemplos adecuados se describen aquí) se mezcla con el sobrenadante de suero de jugo celular concentrado para producir una fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado. La fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado es una fracción bioactiva es decir libre de γ -lactonas α -insaturadas, y particularmente libre de partenolida. En una realización, la "fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado" corresponde al ingrediente bioactivo C (véase Figura 1 y la sección de Ejemplos).

La solicitud también divulga ingredientes bioactivos elaborados a partir de los métodos descritos anteriormente, que incluyen, por ejemplo, los ingredientes bioactivos que contienen (i) el precipitado de fracción de citoplasma producido por los métodos divulgados aquí; (ii) la fracción de suero de jugo celular estabilizado producida por los métodos divulgados aquí; y (iii) la fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado producida por los métodos divulgados aquí. Estos ingredientes bioactivos tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante.

Por vía de ejemplo, una realización del proceso general para preparar los ingredientes bioactivos de la presente invención (por ejemplo, ingrediente bioactivo A, ingrediente bioactivo B, e ingrediente bioactivo C) se muestra esquemáticamente en la Figura 1. Los detalles de las etapas de este proceso se describen adicionalmente adelante en esta Descripción Detallada y en los Ejemplos.

Como se representa en la Figura 1, se proporciona la matricaria 10 fresca (es decir, la biomasa fresca de matricaria). En una realización, la etapa descrita en este párrafo corresponde a la etapa definida como "proporcionar biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*)".

La matricaria 10 fresca se somete a trituración, maceración, y prensado 12 bajo condiciones efectivas para separar la matricaria 10 fresca en el jugo 16 celular y material enriquecido con fibra 14. El jugo 16 celular luego se somete a clarificación 18 bajo condiciones efectivas para producir jugo 20 celular clarificado. El jugo 20 celular clarificado se somete a ajuste de pH/tratamiento 22 con microondas y luego enfriamiento/centrifugación 24 bajo condiciones efectivas para producir el Precipitado I 26 (fracción de membrana) y el Sobrenadante I 30 (sobrenadante de jugo celular). Esta etapa es efectiva en someter a partición una cantidad sustancial de las γ -lactonas α -insaturadas (particularmente partenolida) en el Precipitado I 26, que también incluye gran parte del material de membrana encontrado en el jugo 20 celular clarificado. Cuando se utiliza para describir la cantidad de γ -lactonas α -insaturadas (particularmente partenolida) contenida en el Precipitado I 26, el término "cantidad sustancial" se refiere a un contenido de γ -lactonas α -insaturadas (particularmente partenolida) que excede 0.01% en peso y/o que es comparable con el contenido de γ -lactonas α -insaturadas (particularmente partenolida) en la matricaria fresca. De esta manera, el Sobrenadante I 30 que se produce por esta etapa incluye jugo celular, es decir por lo menos sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas, y particularmente por lo menos sustancialmente libres de partenolida. En una realización, la etapa descrita en este párrafo corresponde a la etapa definida como "procesar la biomasa fresca bajo condiciones efectivas para producir un sobrenadante de jugo celular y una fracción de membrana".

El Sobrenadante I 30 se somete a precipitación isoeléctrica 32 y después de esto centrifugación 34 bajo condiciones efectivas para producir el Sobrenadante II 40 (por ejemplo, primer sobrenadante de suero de jugo celular) y el Precipitado II 36 (por ejemplo, precipitado de fracción de citoplasma). En una realización, la etapa descrita en este párrafo corresponde a la etapa definida como "tratar el sobrenadante de jugo celular bajo condiciones efectivas para producir un primer sobrenadante de suero de jugo celular y un precipitado de fracción de citoplasma".

Luego se aísla el Precipitado II 36. En una realización, Precipitado II 36 corresponde al ingrediente bioactivo A, y es sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas, y particularmente sustancialmente libres de partenolida. En una realización, la etapa descrita en este párrafo corresponde a la etapa definida como “aislar el precipitado de fracción de citoplasma”. El Precipitado II 36 (Ingrediente Bioactivo A) también tiene diversas bioactividades favorables, que incluyen, pero no se limitan a, actividad antiinflamatoria y antioxidante.

El Sobrenadante II 40 (por ejemplo, primer sobrenadante de suero de jugo celular) se somete a ajuste de pH 42 y después de esto se somete a clarificación 44 bajo condiciones efectivas para el Sobrenadante 50 Final (también mencionado en una realización el “segundo sobrenadante de suero de jugo celular”). El Sobrenadante 50 Final luego se somete a mezcla con el estabilizador 52 bajo condiciones efectivas para producir el ingrediente bioactivo B 60 (también mencionado en una realización como la “fracción de suero de jugo celular estabilizado”). El ingrediente bioactivo B 60 es sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas, y particularmente sustancialmente libre de partenolida. En una realización, las etapas colectivas descritas en este párrafo corresponden a las etapas definidas como (i) “clarificar el primer sobrenadante de suero de jugo celular bajo condiciones efectivas para producir un segundo sobrenadante de suero de jugo celular”; y (ii) “mezclar un agente de estabilización con el segundo sobrenadante de suero de jugo celular bajo condiciones efectivas para producir una fracción de suero de jugo celular estabilizado”. El ingrediente bioactivo B 60 también tiene diversas bioactividades favorables, que incluyen, pero no se limitan a, actividad antiinflamatoria y antioxidante.

El ingrediente bioactivo B 60 se somete a evaporación 62 bajo condiciones efectivas para concentrar el ingrediente bioactivo B 60 para producir el Sobrenadante Final Concentrado 70 (también mencionado en una realización como el “sobrenadante de suero de jugo celular concentrado”). En una realización, esta etapa corresponde a la etapa definida como “concentrar la fracción de suero de jugo celular estabilizado bajo condiciones efectivas para producir un sobrenadante de suero de jugo celular concentrado”. El Sobrenadante Final Concentrado 70 luego se somete a mezclar con estabilizador 72 bajo condiciones efectivas para producir ingrediente bioactivo C 80 (también se menciona en una realización como la “fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado”). En una realización, esta etapa corresponde a la etapa de “mezclar un agente de estabilización con el sobrenadante de suero de jugo celular concentrado bajo condiciones efectivas para producir una fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado”. El ingrediente bioactivo C 80 es libre de γ -lactonas α -insaturadas, y particularmente libre de partenolida. El ingrediente bioactivo C 80 también tiene diversas bioactividades favorables, que incluyen, pero no se limitan a, actividad antiinflamatoria y antioxidante.

Los ingredientes bioactivos divulgados en la solicitud incluyen todo el jugo celular derivado de fracciones bioactivas representadas en la Figura 1, a saber, las fracciones bioactivas representadas por lo siguiente: (i) Sobrenadante I 30; (ii) Sobrenadante II 40; (iii) Precipitado II 36 (Ingrediente Bioactivo A); (iv) Sobrenadante 50 Final; (v) ingrediente bioactivo B 60; (vi) Sobrenadante Final Concentrado 70; y (vii) ingrediente bioactivo C 80. Las fracciones bioactivas representadas por aquellas enumeradas en este párrafo son cada una ya sea libres de o sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas, y particularmente libre de o sustancialmente libres de partenolida. Adicionalmente, las fracciones bioactivas representadas por aquellas enumeradas en este párrafo cada una tiene actividad antiinflamatoria y antioxidante.

La solicitud también divulga composiciones bioactivas que incluyen una mezcla de una o más fracciones bioactivas aisladas derivadas de jugo celular de biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*). Las fracciones bioactivas adecuadas pueden incluir, sin limitación, cualquiera de las fracciones bioactivas divulgadas aquí. En particular, las fracciones bioactivas adecuadas son cada una ya sea libres de o sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas, y particularmente libres de o sustancialmente libres de partenolida. Adicionalmente, las fracciones bioactivas adecuadas tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante. La composición bioactiva puede incluir, sin limitación, una mezcla de una o más de las fracciones bioactivas/ingredientes bioactivos descritos en la Figura 1, a saber, el Sobrenadante I 30, el Sobrenadante II 40, Precipitado II 36 (Ingrediente Bioactivo A), el Sobrenadante 50 Final, ingrediente bioactivo B 60, el Sobrenadante Final Concentrado 70, y/o ingrediente bioactivo C 80. Las composiciones bioactivas son ya sea libres de o sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas, y particularmente libres de o sustancialmente libres de partenolida. Las composiciones bioactivas también tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante. La composición bioactiva también puede incluir un agente de estabilización. Los métodos para combinar una o más fracciones bioactivas para producir las composiciones bioactivas son bien conocidos en la técnica, y se contemplan dentro de esta divulgación.

Los ingredientes bioactivos y composiciones bioactivas divulgadas en la solicitud se pueden utilizar en diversos métodos para mamíferos (que incluyen humanos). Adicionalmente, debido a la baja concentración de partenolida (o la ausencia de partenolida en total) en los ingredientes bioactivos, los métodos para utilizar los ingredientes bioactivos pueden incluir aplicaciones que son seguras no solo para adultos, pero también para niños de todas las edades (que incluyen, sin limitación bebés, niños pequeños, y jóvenes, y adolescentes).

Se resumen adelante realizaciones adicionales de los ingredientes bioactivos de la presente invención.

En una realización, los ingredientes bioactivos se derivan de biomasa aérea fresca de matricaria en cualquier etapa de crecimiento, que incluye, pero no se limita por, las etapas que proporcionan rendimiento máximo: desde la etapa temprana de la floración completa (10% de flores) hasta la etapa de floración completa (100% de flores).

5 En una realización, los ingredientes bioactivos se pueden derivar de fitomasa fresca, que se puede recolectar de plantas cultivadas en el primer año y/o los siguientes años de crecimiento.

En otra realización, los ingredientes bioactivos se pueden derivar de fitomasa fresca, que se cultiva en los campos y/o en los invernaderos y/o en fitotrón y/o en cultivos de tejido y/o en callos.

Los ingredientes bioactivos adecuados pueden incluir, sin limitación, cualesquier componentes de una célula vegetal, que no tiene unión y/o afinidad a γ -lactonas α -insaturadas, particularmente a partenolida.

10 Los ingredientes bioactivos adecuados pueden incluir, sin limitación, cualesquier componentes de una célula vegetal que tengan propiedades inflamatorias y no tengan unión y/o afinidad a γ -lactonas α -insaturadas, particularmente a partenolida.

15 Los ingredientes bioactivos adecuados pueden incluir, sin limitación, cualesquier componentes de la célula vegetal que tengan actividad inhibidora contra las proteinasas liberadas durante la respuesta inflamatoria en tejidos humanos. Las proteinasas anteriores pueden incluir, pero no se limitan a, elastasa de neutrofilo humano, que es una de las enzimas más destructivas entre proteinasas. Debido a que la elastasa puede degradar diversos componentes de la matriz extracelular de tejidos humanos, los inhibidores de la elastasa son considerados como importantes bioactivos capaces de reducir el daño de tejido asociado con una amplia variedad de afecciones inflamatorias. Aunque en sí misma la partenolida purificada demuestra cierta actividad antielastasa, se encontró inesperadamente que los ingredientes bioactivos sustancialmente libres de partenolida y completamente libres de partenolida tienen una mayor actividad inhibidora de la elastasa, que aproximadamente tiene dos órdenes de magnitud mayor que la actividad de la partenolida purificada

Se encontró que los ingredientes bioactivos que no tienen unión y/o afinidad a γ -lactonas α -insaturadas, particularmente a partenolida, tienen una actividad antielastasa que es superior a la actividad de la partenolida pura.

25 Los ingredientes bioactivos adecuados pueden incluir, sin limitación, cualesquier componentes de células vegetales que tienen propiedades inhibidoras de elastasa y no tienen unión y/o afinidad a γ -lactonas α -insaturadas, particularmente a partenolida.

30 Los ingredientes bioactivos adecuados de la presente invención puede incluir, sin limitación, cualesquier componentes de célula vegetal que tengan propiedades antioxidantes y no tengan unión y/o afinidad a γ -lactonas α -insaturadas, particularmente a partenolida.

La solicitud también divulga ingredientes bioactivos, que son (i) sustancialmente o completamente libres de γ -lactonas α -insaturadas, particularmente de partenolida, y tienen propiedades (ii) antiinflamatorias, y (iii) antioxidantes deseables para el cuidado de la piel que incluyen aplicaciones tópicas y orales.

35 Los ingredientes bioactivos adecuados pueden incluir, sin limitación, cualesquier componentes de célula vegetal que tengan propiedades antiinflamatorias y antioxidantes y no tengan unión y/o afinidad a γ -lactonas α -insaturadas, particularmente a partenolida.

Los ingredientes bioactivos adecuados pueden incluir, sin limitación, cualesquier componentes de célula vegetal que tienen propiedades inhibidoras y antioxidantes de elastasa y no tienen unión y/o afinidad a γ -lactonas α -insaturadas, particularmente a partenolida.

40 La solicitud también divulga un método para aislar a partir del jugo celular de biomasa fresca de una matricaria (*Tanacetum parthenium*) los ingredientes bioactivos para el cuidado de la piel, que son (i) sustancialmente o completamente libres de γ -lactonas α -insaturadas, particularmente de partenolida, y que poseen propiedades (ii) antiinflamatorias, y/o (iii) antioxidantes.

45 La presente invención también se relaciona con un método para aislar del jugo celular obtenido de la biomasa fresca de una matricaria (*Tanacetum parthenium*) los ingredientes bioactivos para el cuidado de la piel, que son (i) sustancialmente o completamente libres de γ -lactonas α -insaturadas, particularmente de partenolida, y que poseen (ii) propiedades inhibidoras, y/o (iii) antioxidantes de elastasa.

En una realización, el método de la presente invención involucra biomasa fresca de una matricaria (*Tanacetum parthenium*). La biomasa fresca luego se separa en el jugo celular y un material enriquecido con fibra.

- 5 Cabe señalar que, dependiendo de las condiciones de cultivo de la matricaria, año de crecimiento, y en particular de la cosecha, el contenido de materia seca de la biomasa de la planta puede variar significativamente y puede afectar a la consistencia de las propiedades del jugo celular y por lo tanto la reproducibilidad de los ingredientes bioactivos derivados de jugo celular. La presente invención permite la estandarización de las propiedades de jugo celular para mejorar la reproducibilidad de ingredientes bioactivos.
- En una realización, la normalización de las propiedades del jugo celular se mejora mediante la exploración de condiciones uniformes de cultivo y cosecha de matricaria.
- 10 En otra realización, el ajuste adecuado de los regímenes de trituración, maceración, y prensado de matricarias frescas permite la obtención de jugo celular que tiene un contenido de materia seca que se varía en un rango relativamente estrecho (por ejemplo, $7.0 \pm 1.6\%$). Por ejemplo, si el contenido de materia seca de la biomasa de la planta se reduce debido a un impacto ambiental, la trituración fina de la matricaria y mayor presión permite que el contenido de la materia seca en el jugo celular aumente y mejore su reproducibilidad. Si el contenido de materia seca en la biomasa vegetal aumenta, se puede utilizar el proceso de trituración y prensado más bajo.
- En otra realización, se proporciona la normalización de jugo celular sin aumento indeseable de su temperatura.
- 15 Cabe señalar que los ajustes anteriores abordan la reproducibilidad de jugo celular, y no necesariamente disminuyen el contenido de γ -lactonas α -insaturadas, en particular de partenolida, en el jugo celular cuando se compara en una base de materia seca con matricaria fresca o con material enriquecido por fibra. Aunque aparentemente se concentra la partenolida en las células de aceite, que se localizan en la superficie de la hoja de la matricaria (véase, por ejemplo, Smith et al., J. Chromatogr., 627:255 (1992); y Smith, R.M., LC GC Int., Jan. 8-15, 1996, que se incorporan aquí mediante referencia en su totalidad), se encontró inesperadamente que la partenolida no se concentra predominantemente en el material enriquecido con fibra sino más bien se distribuye entre el material superior y el jugo celular.
- 20 En una realización, el material enriquecido con fibra se seca o se puede almacenar en condiciones de congelación.
- En otra realización, la partenolida que contiene material enriquecido con fibra se utiliza para aplicaciones convencionales de derivados de matricaria que se utilizan comúnmente en la técnica.
- 25 El jugo celular de matricaria fresca es una dispersión coloidal relativamente estable que tiene un color verde oscuro. Este color se debe a los cloroplastos y sus fragmentos, que se dispersan en la fase continua de jugo celular que tiene color marrón y enriquecida con otros componentes del citoplasma. Se encontró inesperadamente que en esta dispersión coloidal las γ -lactonas α -insaturadas, en particular partenolida, tienen una fuerte unión y/o afinidad con los cloroplastos y sus fragmentos.
- 30 En una realización, la eliminación de los cloroplastos y sus fragmentos del jugo celular permite la obtención de una fase de jugo celular continua, que es sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas, en particular de partenolida. La eliminación de estos compuestos no deseables del jugo celular se puede lograr mediante diferentes tratamientos, que incluyen, pero no se limitan a, ajuste de pH, tratamiento térmico, radiación de microondas, centrifugación, microfiltración, ultrafiltración y combinaciones de los mismos.
- 35 En una realización, el jugo celular de matricaria fresca se separa en un precipitado de pasta verde oscura que consiste de cloroplastos y un sobrenadante líquido marrón, que es sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas, particularmente de partenolida.
- 40 En otra realización, se puede lograr la separación anterior por medio de centrifugación a media velocidad o alta velocidad (≥ 15.000 g). Como resultado, todos los cloroplastos y sus fragmentos se pueden concentrar en un precipitado (en adelante Precipitado I), y el sobrenadante aislado (en adelante Sobrenadante I) permanece completamente libre de clorofila. Como resultado, casi todo el agrupamiento de partenolida de esta dispersión coloidal se concentra en el Precipitado I y de esta manera el Sobrenadante I tiene ≤ 20 veces menor contenido de partenolida (por ejemplo, 0.03%) en comparación con el jugo celular inicial, es decir, el Sobrenadante I anterior de la presente invención se debe categorizar como sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas, particularmente de partenolida. (El sobrenadante de la presente invención tiene contenido de partenolida residual significativamente reducido en comparación con el nivel de la realización preferida en el extracto de matricaria como se describe en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,224,875 y 6,479,080, que se incorporan en la presente mediante referencia en su totalidad).
- 45 Las centrifugaciones de media y alta velocidad tienen ciertas limitaciones técnicas y/o económicas especialmente a una gran escala industrial. En una realización, el jugo celular de matricaria fresca se trata para reducir la estabilidad de cloroplastos y sus fragmentos, y luego el jugo celular desestabilizado se separa efectivamente utilizando centrifugación a baja velocidad (≤ 3.000 g). El criterio de separación efectiva es la ausencia de máxima clorofila característica en el espectro del Sobrenadante I.
- 50

La presente invención incluye diversos tratamientos para reducir la estabilidad de fase del jugo celular de matricaria que inicia la coagulación de cloroplastos y sus fragmentos. En una realización, se puede reducir la estabilidad del jugo celular utilizando tratamiento de congelación descongelación (≥ 1 ciclo), tratamiento de calor ($\geq 40^\circ\text{C}$), ajuste de pH (pH = 3.0...4.0), y/o combinaciones de los mismos. Los tratamientos anteriores de jugo celular de matricaria con centrifugación a baja velocidad posterior permiten obtener sobrenadante de jugo celular I que contiene 6.5-7.3% de materia seca y solo 0.01-0.035% de partenolida. La separación de cloroplastos y sus fragmentos permiten la producción del Sobrenadante I, que es sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas, particularmente de partenolida.

En una realización, se puede aumentar el contenido de materia seca en el Sobrenadante I sin cambios significativos en su contenido de partenolida. De esta manera, antes de la separación, el jugo celular se trata con agitación intensa (por ejemplo, utilizando rotóstat) u homogenización (por ejemplo, utilizando homogenizador de politrón) o con tratamiento ultrasónico o con radiación de microondas, y/o combinaciones de los mismos para permitir que parte de los componentes de cloroplastos no tengan unión y/o afinidad fuerte de γ -lactonas α -insaturadas, particularmente de partenolida, para moverse en fase continua (soluble) de dispersión. El proceso anterior permite aumento adicional del contenido de materia seca en el Sobrenadante I sin elevación del contenido de γ -lactonas α -insaturadas, particularmente de partenolida. Como resultado, los cloroplastos separados y sus fragmentos pueden capturar en el Precipitado I solo 15-20% del jugo celular de materia seca total y de esta manera 80-85% de la materia seca total permanece en el sobrenadante de jugo celular I enriquecido.

En una realización, el Precipitado I enriquecido con γ -lactonas α -insaturadas, particularmente de partenolida, se almacena a temperatura $\leq -20^\circ\text{C}$. En otra realización, el Precipitado I se seca (por ejemplo, utilizando liofilizador o secador de pulverización o secador de lecho fluido). En otra realización, se conserva el Precipitado I (por ejemplo, con 0.75% de Lactona Glucono Delta y 0.25% de Eritrato de Sodio o con 1.0% de Phenonip) y luego se almacena en condiciones refrigeradas.

La partenolida que contiene el Precipitado I se utiliza para aplicaciones convencionales de derivados de matricaria que se utilizan comúnmente en la técnica.

Aunque el Sobrenadante I es sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas, particularmente de partenolida, la presente invención permite eliminación cuantitativa de los componentes no deseados del sobrenadante sin reducir sus bioactividades deseables.

En una realización, la eliminación cuantitativa de las γ -lactonas α -insaturadas residuales, particularmente de partenolida, se logra al utilizar diferentes tratamientos adicionales del Sobrenadante I. Estos tratamientos incluyen, pero no se limitan por, los siguiente: (i) aumento en el pH del Sobrenadante I ($6.0 \leq \text{pH} \leq 10.0$), que inicia precipitación isoeléctrica de los componentes que tienen afinidad a γ -lactonas α -insaturadas, particularmente de partenolida; (ii) separación de componentes precipitados utilizando centrifugación y/o filtración para permitir concentración de los componentes anteriores en el Precipitado II; (iii) ajuste de pH del Sobrenadante II obtenido al valor de pH inicial del jugo celular; y (iv) clarificación adicional del Sobrenadante II utilizando centrifugación y/o filtración o micro-filtración ($\leq 0.22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro) o ultrafiltración (corte de peso molecular ≥ 10.000 Dalton) para permitir la obtención de Sobrenadante Final. Lo anterior resulta en el aislamiento del Sobrenadante Final, que está completamente libre de γ -lactonas α -insaturadas, particularmente de partenolida, pero contiene todas las bioactividades deseables.

En una realización, el Precipitado II resultante se seca (por ejemplo, utilizando liofilizador o secador de pulverización o secador de lecho fluido). En otra realización, el Precipitado II se almacena en condiciones de congelación.

En una realización, la estabilización del Sobrenadante Final se completó al agregar conservantes como se ha descrito previamente en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 2003/0175235, que se incorpora aquí mediante referencia en su totalidad, e incubar la mezcla hasta que se logra la solubilización completa. Los conservantes utilizados fueron los siguientes: Sorbato de potasio al 0.1%, benzoato de sodio al 0.1%, metil parabeno de sodio al 0.1%, metabisulfito de sodio al 0.1%, y 0.1% de ácido cítrico al 75%. El Sobrenadante Final conservado se almacena en condiciones ambientales.

En una realización, el Sobrenadante Final se concentra utilizando evaporación o diálisis o electrodiálisis u ósmosis inversa o combinación de los mismos. La evaporación se seleccionó como técnica preferible debido a que permite la integridad de los ingredientes bioactivos que se van a conservar sin eliminación indeseable de cualquiera de los componentes distintos del agua.

En otra realización, el Sobrenadante Final Concentrado, que es una suspensión de color marrón oscuro opalescente inestable capaz de formar espontáneamente precipitado de color beige claro, se mezcla con el estabilizador, que incluye, pero no se limitan por, $\geq 5.0\%$ de glicerina o pentilenglicol (1,2-pentanodiol o 1,2-Dihidroxipentano).

La presente invención se refiere adicionalmente a los ingredientes bioactivos aislados, que son sustancialmente libres o completamente libres de γ -lactonas α -insaturadas, en particular de partenolida, y tienen bioactividades deseables:

Precipitado II (Ingrediente Bioactivo A), Sobrenadante Final (Ingrediente Bioactivo B), y Sobrenadante Final Concentrado (Ingrediente Bioactivo C).

Los ingredientes bioactivos aislados se pueden combinar con un agente estabilizador. Los agentes estabilizadores adecuados en particular pueden incluir, sin limitación, un conservante, un antioxidante, y/o mezclas de los mismos.

5 Los ingredientes bioactivos aislados se pueden concentrar y luego estabilizar para posterior utilización en el cuidado de la piel para aplicaciones orales y tópicas.

Los ingredientes bioactivos adicionalmente pueden incluirse en sistemas de suministro que se utilizan comúnmente en la técnica.

10 Todos los ingredientes bioactivos se pueden utilizar como soluciones, suspensiones, dispersiones, pastas o polvos secos incorporados en productos de cuidado de la piel, incluyendo aplicaciones tópicas y orales.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar las realizaciones particulares de la presente invención, pero de ninguna manera son destinados a limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1 - Preparación de ingredientes bioactivos derivados de matricaria fresca

15 A continuación se presenta una descripción de los aspectos pertinentes de una realización del método de la presente invención.

20 Se cosechó una cantidad suficiente de partes aéreas de matricaria fresca (*Tanacetum parthenium*) en la etapa de de crecimiento de floración completa para producir aproximadamente 100 kg de materia seca. El nivel de materia seca en la matricaria fresca que se midió fue 23.77%, lo que requiere cosechar aproximadamente 420.7 kg de fitomasa de planta fresca para producir 100 kg de materia seca. El cromatograma de HPLC de la matricaria utilizado se presenta en la Figura 2.

25 Se tuvo cuidado de conservar el contenido de humedad inherente de la matricaria fresca y para evitar el marchitamiento debido a la pérdida de humedad. La cosecha se realizó de tal manera que se evitó o minimizó el picado, maceración, y trituración de la matricaria fresca recogida. Todas las etapas se completaron en el menor tiempo posible. Esto se hizo para minimizar la exposición de la matricaria fresca al sol, alta temperatura y otros factores ambientales negativos.

Luego, se realizó la etapa de lavado para eliminar las partículas de tierra y otros residuos de las plantas antes del procesamiento adicional. Éste se logró mediante el lavado de la matricaria cosechada durante ≤ 5 minutos en agua a presión ≤ 1 kg/cm². El lavado con agua residual no contiene cualesquier pigmentos verdes o marrones, lo que indica la presión del agua adecuada y la duración del lavado. El exceso de agua se elimina de la fitomasa lavada.

30 La matricaria lavada se sometió a trituración, maceración, y prensado para obtener el contenido intracelular (es decir, el jugo celular) y para separarlo del material enriquecido con fibra. Un molino de martillos (Modelo VS 35, Vincent Corporation, Tampa, FL) que tiene motor de 5 HP y un grupo de tamices se utiliza para moler la biomasa para producir partículas de tejido de matricaria de adecuadamente pequeño tamaño en una cantidad más corta de tiempo y sin aumento significativo de la temperatura de biomasa. El molino de martillos se estableció para producir el tamaño máximo de partículas de plantas maceradas de ≤ 2.0 centímetros durante ≤ 10 segundos de tratamiento. La temperatura de la biomasa solo se incrementó $\leq 5^\circ\text{C}$.

40 Una prensa de tornillo continuo horizontal (Prensa Compacta CP-6, Vincent Corporation, Tampa, FL), equipada con cono soportado por aire comprimido, se utilizó inmediatamente para obtener jugo celular de matricaria macerada. La presión en el cono se mantuvo a un nivel de ≥ 20 kg/cm², con una velocidad de tornillo de 12 rpm y sólo un aumento de temperatura de $\leq 5^\circ\text{C}$.

Este tratamiento produjo material enriquecido con fibra y el jugo celular. Las partículas residuales pequeñas de fibra se retiraron adicionalmente de jugo celular utilizando para su aclaración semiautomática centrífuga de flujo continuo (Modelo 12-413V, AML Industries, Inc., Hatboro, PA) a ≤ 3000 rpm y tiempo de retención ≥ 30 segundos. El precipitado se recolectó y se combinó con material enriquecido con fibra obtenido después del prensado de la matricaria.

45 Los procesos descritos anteriormente permiten la producción de 217.2 kg de jugo celular matricaria tiene nivel de materia seca 8.20% y 203.5 kg de material enriquecido con fibra que tiene el nivel de materia seca 40.39%. El cromatograma de HPLC de material enriquecido con fibra se presenta en la Figura 3.

El jugo celular luego se sometió a diversos tratamientos, que incluyen ajuste de pH, radiación de microondas y separación. El pH de jugo celular de matricaria fresca (pH inicial = 5.3) se ajustó utilizando un método de titulación utilizando 3.6 litros de Ácido Clorhídrico 5.0 N (HCl) para reducir el pH del jugo celular a 3.5. Luego el jugo celular ajustado se expuso inmediatamente a radiación de microondas utilizando el sistema de flujo continuo especialmente diseñado que tiene 2.45 GHz de frecuencia y 3.200 vatios de potencia de salida (Microwave Research & Applications, Inc., Laurel, MD). Este sistema se equipó con agitador de velocidad constante BDC 1850 (Caframo Ltd., Warton, Ontario, Canadá) y una sonda de control de temperatura. Este tratamiento continuó hasta que la temperatura del jugo celular en la cámara de microondas alcanzó 92°C y luego el jugo celular tratado se bombeó inmediatamente a través de un dispositivo de flujo continuo que se conectó con un enfriador 1 de recirculación de HP (Modelo 6106 P, Polyscience Corporation, Niles, IL).

Después de que se redujo la temperatura del jugo celular tratado a $\leq 30^{\circ}\text{C}$, el material se separó utilizando una centrífuga de flujo continuo CEPA LE (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Alemania) a 15.000 rpm y tiempo de retención ≥ 30 seg. La separación de 220.8 kg de jugo celular tratado produjo 19.2 kg de precipitado de pasta de color verde oscuro (en adelante Precipitado I) que tiene un contenido de materia seca de 26.2% y 201.6 kg del sobrenadante líquido ligeramente opalescente de color marrón (en adelante el Sobrenadante I) que tiene contenido de materia seca de 6.34%.

El cromatograma de HPLC del Precipitado I se presenta en la Figura 4. Es de destacar que el perfil de HPLC mostrado en la Figura 4 para Precipitado I es significativamente diferente del perfil de HPLC del extracto de matricaria descrito en la Patente Estadounidense No. 6.479,080 (véase Figura 1). Por lo tanto, la composición del precipitado I y del extracto de matricaria descrito en la Patente Estadounidense No. 6,479,080 son significativamente diferentes.

El sobrenadante I luego se sometió a un tratamiento adicional, que incluye ajustes de pH y separaciones. El primer ajuste de pH se indujo utilizando un método de titulación que utiliza 1.07 litros de hidróxido de potasio (KOH) al 50% para aumentar el pH del Sobrenadante I del jugo celular desde 3.5 hasta 9.0. Este tratamiento resultó en opalescencia desarrollada y color más oscuro del material que se clarificó inmediatamente utilizando centrífuga de flujo continuo CEPA LE (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Alemania) a 15.000 rpm y tiempo de retención ≥ 30 seg. La separación anterior produjo 0.55 kg de precipitado de pasta de color beige oscuro (en adelante Precipitado II) que tiene un contenido de materia seca de 38.2% y 202.12 kg de sobrenadante ligeramente opalescente de color marrón (en adelante Sobrenadante II) que tiene un contenido de materia seca de 6.22%.

El cromatograma de HPLC del Precipitado II se presenta en la Figura 5. Es de destacar que el perfil de HPLC mostrado en la Figura 5 para el Precipitado II es significativamente diferente del perfil de HPLC del extracto de matricaria descrito en la Patente Estadounidense No. 6.479,080 (véase Figura 1). Por lo tanto, la composición del precipitado II y del extracto de matricaria descrito en la Patente Estadounidense No. 6,479,080 son significativamente diferentes.

El Precipitado II contenía 0.01% de partenolida según se determina mediante análisis de HPLC representa el Ingrediente Bioactivo A, que es sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas, en particular de partenolida.

El Sobrenadante II se sometió a titulación isoeléctrica utilizando Ácido Clorhídrico (HCl) 5.0 N para devolver el valor de pH a pH = 3.5 que existía en el sobrenadante I. Dicho tratamiento inicial lleva a una ligera mayor opalescencia del material, pero se clarificó efectivamente utilizando centrífuga de flujo continuo CEPA LE (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Alemania) a 15.000 rpm y tiempo de retención ≥ 60 seg. El material clarificado (en adelante sobrenadante final) contenía $<0.00007\%$ de partenolida según se determina por análisis de HPLC y, por lo tanto, de acuerdo con los límites de detección, el Sobrenadante Final anterior se debe considerar libre de partenolida, y en particular completamente libre de partenolida.

La estabilización del Sobrenadante Final se logró al agregar conservantes y antioxidantes e incubar la mezcla hasta que se consiguió completa solubilización. Los conservantes y antioxidantes utilizados incluyen los siguientes: sorbato de potasio al 0.1%, benzoato de sodio al 0.1%, metilparabeno de sodio al 0.1%, y metabisulfito de sodio al 0.2%. Esta preparación resultó en la producción de 201.6 kg de Ingrediente Bioactivo B que contiene 6.8% de materia seca. El rendimiento de Ingrediente Bioactivo B de 100 kg de Materia Seca de la biomasa de matricaria inicial es de aproximadamente 12.5 kg de Materia Seca.

El cromatograma de HPLC de Ingrediente Bioactivo B se presenta en la Figura 6. Es de destacar que el perfil de HPLC mostrado en la Figura 6 para el Ingrediente Bioactivo B es significativamente diferente del perfil de HPLC del extracto de matricaria descrito en la Patente Estadounidense No. 6,479,080 (véase Figura 1). Por lo tanto, la composición de Ingrediente Bioactivo B y del extracto de matricaria descrito en la Patente Estadounidense No. 6,479,080 son significativamente diferentes.

El Ingrediente Bioactivo B también se concentró utilizando el sistema de evaporación de vacío Vap rápido (Labconco, Kansas City, MO) equipado con ocho tubos de 0.6 litros, trampa de líquido de 2.550 litros y bomba de vacío de diafragma (modelo 2018B-01, Welch Rietsche Thomas, Skokie, IL). Utilizando presión de trabajo = 100 mbar,

5 temperatura = 60°C y velocidad de vórtice = 40%, el Ingrediente Bioactivo B se concentró en ciclos de 90 minutos para producir 63.16 litros totales (o 70.11 kg) de material concentrado que tiene un contenido de materia seca de 19.89%. Luego 5.0% (w/w) de pentilenglicol se agregó al material concentrado y después de mezclado moderado durante ≥ 60 segundos se produjo el líquido transparente de color marrón oscuro resultante: Ingrediente Bioactivo C. El Ingrediente Bioactivo C contenía <0.00007% de partenolida según se determina por análisis de HPLC y, por lo tanto, de acuerdo con los límites de detección, el Ingrediente Bioactivo C anterior se debe considerar libre de partenolida, y en particular totalmente libre de partenolida.

10 El cromatograma de HPLC del Ingrediente Bioactivo C se presenta en la Figura 7. Es de destacar que el perfil de HPLC mostrado en la Figura 7 para el Ingrediente Bioactivo C es significativamente diferente del perfil de HPLC del extracto de matricaria descrito en la Patente Estadounidense No. 6,479,080 (véase Figura 1). Por lo tanto, la composición de Ingrediente Bioactivo C y del extracto de matricaria descrito en la Patente Estadounidense No. 6,479,080 son significativamente diferentes.

Ejemplo 2 - Características y propiedades del Ingrediente Bioactivo B

15 El Ingrediente Bioactivo B se preparó de acuerdo con el proceso descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Se realizaron análisis de Ingrediente Bioactivo B para determinar sus diversas características fisicoquímicas, químicas, y microbianas.

Las características fisicoquímicas y químicas seleccionadas del Ingrediente Bioactivo B se presentan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1 - Características fisicoquímicas y químicas seleccionadas del Ingrediente Bioactivo B

Parámetro	Resultados
Apariencia	Líquido amarillo-marrón
Olor	Característico
Color (Escala Gardner)	11.5
Materia seca, %	6.6
Gravedad específica, g/cm ³	1.030
Índice refractivo, nD	1.3112
pH	4.1
UV máxima, nm	269
Partenolida, %	< 0.00007

20 El Ingrediente Bioactivo B es fácilmente soluble en agua en cualquier proporción.

La Tabla 2 a continuación describe las características microbianas del Ingrediente Bioactivo B. Estos datos demuestran que el Ingrediente Bioactivo B satisface los requisitos de la industria para el cuidado de la piel con respecto al conteo de placa total, el conteo de moho y levadura, y la ausencia de patógenos.

Tabla 2 - Características microbianas del Ingrediente Bioactivo B

Parámetro	Resultados
Conteo de placa total, CFU*/g	< 100
Moho y levadura, CFU*/g	< 10

<i>Escherichia coli</i>	Negativo
<i>Salmonella sp.</i>	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
<i>Pseudomonas sp.</i>	Negativo
*Unidades formadoras de colonia	

Los resultados de la prueba de efectividad antimicrobiana presentados en la Tabla 3 a continuación indican, que el Ingrediente Bioactivo B tiene un sistema efectivo de conservantes.

Tabla 3 - Resultados de la prueba de efectividad antimicrobiana del Ingrediente Bioactivo B

Microorganismo	Unidades formadoras de colonia, CFU/g				
	Conteo inicial	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.13 x 10 ⁹	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Escherichia coli</i>	4.16 x 10 ⁸	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.0 x 10 ⁸	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Candida albicans</i>	5.28 x 10 ⁷	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Aspergillus niger</i>	5.5 x 10 ⁷	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Burkholderia cepacia</i>	7.56 x 10 ⁸	< 10	< 10	< 10	< 10

5

La Tabla 4 incluye los datos relacionados con las actividades antiinflamatorias y antioxidantes del Ingrediente Bioactivo B. La actividad antiinflamatoria se determinó utilizando ensayo de elastasa de neutrófilos humana y la actividad antioxidante se determinó utilizando el ensayo de reducción de citocromo c.

Tabla 4 – Actividades antiinflamatorias y antioxidantes del Ingrediente Bioactivo B

Parámetro	Resultados
Actividad antiinflamatoria (IC ₅₀), µl	48.3
Actividad antioxidante (IC ₅₀), µl	7.5

10

Se determinó que el Ingrediente Bioactivo B era estable (es decir, que mantiene la integridad física y química) durante por lo menos 12 meses, mientras que se almacena a una temperatura de entre 15 y 25°C en un recipiente cerrado protegido de la luz.

Ejemplo 3 - Características y propiedades del Ingrediente Bioactivo C

15 El Ingrediente Bioactivo C se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 anterior. Se realizaron análisis del Ingrediente Bioactivo C para determinar sus diversas características de bioactividad fisicoquímicas, químicas y microbianas.

Las características fisicoquímicas y químicas seleccionadas del Ingrediente Bioactivo C se presentan a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Características fisicoquímicas y químicas seleccionadas del Ingrediente Bioactivo C

Parámetro	Resultados
Apariencia	Líquido rojo marrón
Olor	Característico
Color (Escala Gardner)	18.5
Materia seca, %	19.82
Gravedad específica, g/cm ³	1.117
Índice refractivo, nD	1.3770
pH	4.1
UV máxima, nm	255
Partenolida, %	< 0.00007

- 5 El Ingrediente Bioactivo C es fácilmente soluble en agua en cualquier proporción.

La Tabla 6 a continuación describe las características microbianas del Ingrediente Bioactivo C. Estos datos demuestran que el Ingrediente Bioactivo C satisface los requisitos de la industria del cuidado de la piel con respecto a conteo final, conteo de moho y levadura, y la ausencia de patógenos.

Tabla 6 - Características microbianas del Ingrediente Bioactivo C

Parámetro	Resultados
Conteo de placa Total, CFU*/g	< 100
Moho y levadura, CFU*/g	< 10
<i>Escherichia coli</i>	Negativo
<i>Salmonella sp.</i>	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
<i>Pseudomonas sp.</i>	Negativo
*Unidades formadoras de colonia.	

10

La Tabla 7 se refiere a las actividades antiinflamatorias y antioxidantes del Ingrediente Bioactivo C. La actividad antiinflamatoria se determinó utilizando el ensayo de elastasa de neutrófilos humana y la actividad antioxidante se determinó utilizando el ensayo de reducción de citocromo c.

Tabla 7 -Actividades biológicas del Ingrediente Bioactivo C

Parámetro	Resultados
Actividad antiinflamatoria (IC ₅₀), µl	15.2
Actividad antioxidante (IC ₅₀), µl	3.1

Se determinó que el Ingrediente Bioactivo C era estable (es decir, que mantiene la integridad física y química) durante por lo menos 12 meses, mientras que se almacena a una temperatura de entre 15 y 25°C en un recipiente cerrado protegido de la luz.

5 Ejemplo 4 - Características y propiedades del Ingrediente Bioactivo A

El Ingrediente Bioactivo A se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Se realizaron análisis de Ingrediente Bioactivo A para determinar sus diversas características de bioactividad fisicoquímicas, químicas, y microbianas.

10 Las características fisicoquímicas y químicas del Ingrediente Bioactivo A seleccionado se presentan a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8 - Características fisicoquímicas y químicas del Ingrediente Bioactivo A

Parámetro	Resultados
Apariencia	Pasta beige oscuro
Olor	Característico pesado
Color (Valor L*)	27.83
Color (valor a*)	0.57
Color (valor b*)	8.24
Materia seca, %	38.2
Gravedad específica, g/cm ³	1.087
pH	9.0
Partenolida, %	0.01

15 La Tabla 9 a continuación se describe las características microbianas de Ingrediente Bioactivo A. Estos datos demuestran que EL Ingrediente Bioactivo A satisface los requerimientos de la industria del cuidado de la piel con respecto al conteo en placa total, conteo de moho y levadura, y ausencia de patógenos.

Tabla 9 - Características microbianas del Ingrediente Bioactivo A

Parámetro	Resultados
Conteo de placa total, CFU*/g	< 100
Moho y levadura, CFU*/g	< 10

<i>Escherichia coli</i>	Negativo
<i>Salmonella sp.</i>	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
<i>Pseudomonas sp.</i>	Negativo
*Unidades formadoras de colonia	

La Tabla 10 se refiere a las actividades antiinflamatorias y antioxidantes del Ingrediente Bioactivo A. La actividad antiinflamatoria se determinó utilizando el ensayo de elastasa de neutrófilos humana y la actividad antioxidante se determinó utilizando el ensayo de reducción de citocromo c.

5

Tabla 10 -Actividades biológicas del Ingrediente Bioactivo A

Parámetro	Resultados
Actividad antiinflamatoria (IC ₅₀), µl	11.2
Actividad antioxidante (IC ₅₀), µl	2.2

Se determinó que el Ingrediente Bioactivo A es estable (es decir, que mantiene la integridad física y química) durante por lo menos 12 meses, mientras que se almacena en el congelador en un recipiente cerrado protegido de la luz.

10

Ejemplo 5 - Comparación de Ingredientes Bioactivos obtenidos de la matricaria recolectada en diferentes cosechas y en diferentes estaciones

15

Se analizó la reproducibilidad de los Ingredientes Bioactivos utilizando matricaria fresca que se recolectó en dos estaciones consecutivas de los mismos campos. Adicionalmente la matricaria fresca se cosechó dos veces por estación en la misma etapa de crecimiento. Todas las muestras de biomasa de matricaria fresca a anteriores se procesaron utilizando el método descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Los datos relacionados con la comparación del rendimiento, características y propiedades seleccionadas de los Ingredientes Bioactivos B y C se presentan a continuación. (Los datos relacionados con el Ingrediente Bioactivo A no se incluyen en el ejemplo, porque este ingrediente resultó en rendimiento muy pequeño).

20

Se encontró, que a partir de la cantidad de matricaria para producir 100 kg de materia seca de aproximadamente se produjeron 12.4 ± 2.1 kg de materia seca de los Ingredientes Bioactivos. Se podría obtener la materia seca promedio en la biomasa de matricaria fresca ~20% y por lo tanto ~190 kg de Ingrediente Bioactivo B o ~62 kg de Ingrediente Bioactivo C.

25

No se encontró diferencia significativa entre el rendimiento de los Ingredientes Bioactivos obtenidos de la primera y segunda cosecha (valor de p = 0.8893) y entre los Ingredientes Bioactivos obtenidos en dos estaciones consecutivas (valor de p = 0.6531). Adicionalmente no se encontró ninguna diferencia significativa entre el contenido de materia seca en los Ingredientes Bioactivos (valor de p = 0.5334) y el contenido de partenolida en los ingredientes anteriores (valor de p = 0.9923).

30

Las características físicoquímicas y químicas seleccionadas de los Ingredientes Bioactivos, que se obtuvieron de la matricaria fresca recolectada de diferentes cosechas y en diferentes estaciones, se presentan a continuación en la Tabla 11 lo que sugiere una alta reproducibilidad del Ingrediente Bioactivo B e Ingrediente Bioactivo C.

Tabla 11 - Reproducibilidad de los Ingredientes Bioactivos obtenidos a partir de matricaria recolectada en diferentes cosechas y en diferentes estaciones

Parámetro	Ingrediente Bioactivo B Media ± desviación estándar	Ingrediente Bioactivo C Media ± desviación estándar
Apariencia	Líquido amarillo-marrón	Líquido rojo marrón
Olor	Característico	Característico
Color (Escala Gardner)	10 ± 2	≥ 18
Materia seca, %	6.6 ± 1.8	19.8 ± 2.3
Gravedad específica, g/cm ³	1.035 ± 0.01	1.117 ± 0.02
Índice refractivo, nD	1.3112 ± 0.004	1.3704 ± 0.01
pH	3.85 ± 0.4	3.95 ± 0.3
UV máxima, nm	259 ± 3	256 ± 4
Partenolida, %	≤ 0.00007	≤ 0.00007

Cabe señalar, que el contenido de partenolida en los Ingredientes Bioactivos estaba por debajo del límite de detección del procedimiento analítico de HPLC utilizado.

5 La Tabla 12 a continuación describe las características microbianas de los Ingredientes Bioactivos. Estos datos demuestran que los Ingredientes Bioactivos obtenidos a partir de la matricaria recolectada de diferentes cosechas y en diferentes estaciones satisfacen los requisitos para el cuidado de la piel de la industria con respecto a la concentración de gérmenes totales, conteo de mohos y levaduras, y ausencia de agentes patógenos.

Tabla 12 - Características microbianas de los Ingredientes Bioactivos obtenidos a partir de la matricaria recolectada de diferentes cosechas y en diferentes estaciones

Parámetro	Ingrediente Bioactivo B	Ingrediente Bioactivo C
Conteo de placa total, CFU*/g	< 100	< 100
Moho y levadura, CFU*/g	< 10	< 10
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	Negativo
<i>Salmonella sp.</i>	Negativo	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo	Negativo
<i>Pseudomonas sp.</i>	Negativo	Negativo
*Unidades formadoras de colonia.		

10

15 La Tabla 13 se refiere a las actividades antiinflamatorias y antioxidantes de los Ingredientes Bioactivos. La actividad antiinflamatoria se determinó utilizando el ensayo de elastasa de neutrófilos humana y la actividad antioxidante se determinó utilizando el ensayo de reducción de citocromo c. No se encontró diferencia significativa entre las actividades anteriores de los Ingredientes Bioactivos obtenidos a partir de la matricaria fresca recolectada de diferentes cosechas y en diferentes estaciones lo que sugiere una alta reproducibilidad del Ingrediente Bioactivo B y el Ingrediente Bioactivo C.

Tabla 13 –Reproducibilidad de las Actividades biológicas de los Ingredientes Bioactivos obtenidos a partir de la matricaria recolectada de diferentes cosechas y en diferentes estaciones

Parámetro	Ingrediente Bioactivo B Media ± desviación estándar	Ingrediente Bioactivo C Media ± desviación estándar
Actividad antiinflamatoria (IC ₅₀), µl	48 ± 6	14 ± 3
Actividad antioxidante (IC ₅₀), µl	7.5 ± 2.4	3.1 ± 0.5

Los Ingredientes Bioactivos obtenidos a partir de la matricaria recolectada de diferentes cosechas y en diferentes temporadas se determinaron que son estables (es decir, que mantienen la integridad física y química) durante por lo menos 12 meses, mientras que se almacena en el congelador en un recipiente cerrado protegido de la luz.

5 Ejemplo 6 - Protocolos utilizados para determinar ciertas características de los Ingredientes Bioactivos

Lo siguiente son diversos métodos utilizados para la determinación de ciertas características de los Ingredientes Bioactivos. Se hace referencia a estos métodos a través de los Ejemplos anteriores. Las referencias a continuación para los “productos probados” o las “muestras de ensayo” se refieren a Ingredientes Bioactivos.

Método para determinación de materia seca:

- 10 El procedimiento para determinación de materia seca incluye la evaporación del producto probado en el baño de agua a 100°C hasta la evaporación completa del agua, almacenamiento en horno de la muestra a 105°C durante 3 horas, enfriamiento a temperatura ambiente, y determinación inmediata del peso del recipiente con la materia sólida.

Método para la determinación de Valores L* a* b*:

- 15 El procedimiento para la determinación de valores L* a* b* utiliza el colorímetro de geometría fija Hunter Labscan con medición de la geometría de 0°/45°. Se utilizó el iluminante estándar D₆₅ con la ventana de visión hacia arriba. El recipiente con el ingrediente bioactivo probado se colocó en la ventana de visualización y se midió a través de la parte inferior. Se utilizaron las siguientes ecuaciones de CIELAB:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$DE^* = [(DL)^2 + (Da^*)^2 + (Db^*)^2]^{1/2}$$

$$DH = [(\bar{DE}^*)^2 - (DL^*)^2 - (DC^*)^2]^{-1/2}$$

Método para Determinación de contenido de partenolida:

- 20 Las muestras fueron se extrajeron con metanol y tratamiento con ultrasonidos de 30 min. La columna de fase inversa C18 se utilizó como la fase estacionaria y se utilizó acetonitrilo al 44%: agua al 56% y ácido fosfórico al 0.1% como fase móvil. La detección de partenolida fue a 225 nm y las concentraciones de partenolida se determinaron utilizando una curva de calibración de múltiples puntos desarrollada con seis estándares de partenolida (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO) que varía desde 30 µg/g hasta 900 µg/g. El límite de detección en estas condiciones es de 0.7 µg/ml.
- 25 Aproximadamente de 30 µg/g de partenolida se puede cuantificar utilizando este grupo de condiciones.

Método para determinación de características microbiológicas:

- 30 Se determinaron las características microbiológicas de las muestras probadas de acuerdo con el método UPS XXVII de la Farmacopea de Estados Unidos (USP), NF 22, <61>, Pruebas de Límite Microbiológico, que se incorporan aquí mediante referencia en su totalidad. Las pruebas anteriores incluyen conteo total aerobio, mohos y levaduras totales (conteo en placa aeróbica), determinación de Salmonella (sp.), E. coli, Staphylococcus aureus y Pseudomonas sp.

Se realizaron estudios de inoculación de conservantes, utilizando el método USP XXVII, NF 22, <51>, Antimicrobial Effective Testing, pp. 2148-2150, que se incorpora aquí mediante referencia en su totalidad. La incubación de los artículos de prueba inoculados se llevó a cabo a 20 a 25°C y se ensayó en los intervalos de tiempo de 7, 14, 21 y 28 días.

Método para determinación de actividad inhibidora de elastasa:

5 Se determinó la actividad inhibidora de elastasa de ingredientes bioactivos probados utilizando el ensayo, que emplea elastasa de neutrófilos humana (Elastin Products Company, Inc., Owensville, MO) y el sustrato soluble de péptido sintético N-MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-p-NA (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO). Este ensayo incluye el procedimiento modificado como se describe en el Elastin Products Company's Catalog, "Determination of human elastase activity," Research Biochemical Catalog, Elastin Product Company, Inc., Owensville, MO, en la página 84 (2004), que se incorpora aquí mediante referencia en su totalidad. La división enzimática del sustrato se midió a 410 nm y 25°C utilizando regulador de Tris-HCl 0.1 M de pH 7.5 que contiene NaCl 50 mM. El volumen total del medio de reacción en la cubeta del espectrofotómetro fue de 3.0 mL. Cada ingrediente bioactivo probado se ensayó a 10 concentraciones necesarias para lograr inhibición del 50% (IC₅₀) de la velocidad de reacción enzimática.

Método para determinación de actividad de depuración de superóxido:

El método utilizado se basó en el procedimiento descrito en el artículo de Quick et al., "Rapid microplate assay formulación superoxide scavenging efficiency," J. Neuroscience Methods, 97:139-144 (2000), que se incorpora aquí mediante referencia en su totalidad.

15 Este ensayo permite prueba rápida y precisa de los ingredientes bioactivos para determinar la actividad antioxidante comparativa de la depuración de superóxido. El ensayo incluyó hipoxantina, xantina oxidasa y citocromo c. La hipoxantina sirvió como el sustrato y se metabolizó por la xantina oxidasa en un proceso de dos etapas, produciendo dos aniones de superóxido. Estos aniones libres reducen el citocromo c, lo que resulta en el aumento de pico notable a 550 nm. El volumen total del medio de reacción en la cubeta del espectrofotómetro fue de 3.0 mL.

20 Aunque las realizaciones preferidas se han representado y descrito en detalle aquí, será evidente para aquellos expertos en la técnica pertinente que se puede realizar diversas modificaciones, adiciones, sustituciones, y similares sin apartarse del espíritu de la invención y por lo tanto se considera que están dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones que siguen.

Reivindicaciones

1. Un método para aislar una fracción bioactiva que se deriva de jugo celular de biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*) y que está sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas, dicho método comprende:

5 proporcionar biomasa fresca de una planta de matricaria (*Tanacetum parthenium*);

procesar la biomasa fresca bajo condiciones efectivas para producir un sobrenadante de jugo celular es decir por lo menos sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas y una fracción de membrana que contiene γ -lactonas α -insaturadas, dicho procesamiento de la biomasa fresca comprende:

(i) separar la biomasa fresca en un componente de jugo celular y un material enriquecido con fibra; y

10 (ii) sujetar el componente de jugo celular a un ajuste de pH y etapa de tratamiento de microondas para producir el sobrenadante de jugo celular es decir por lo menos sustancialmente libres de γ -lactonas α -insaturadas;

tratar el sobrenadante de jugo celular bajo condiciones efectivas para producir un primer sobrenadante de suero de jugo celular y un precipitado de fracción de citoplasma; y

15 aislar el precipitado de fracción de citoplasma, en el que dicho precipitado de fracción de citoplasma es una fracción bioactiva que está sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas, en la que dichas γ -lactonas α -insaturadas comprenden partenolida.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de procesar la biomasa fresca comprende adicionalmente:

20 clarificar el componente de jugo celular para producir un componente de jugo celular clarificado antes de sujetar el componente de jugo celular al ajuste de pH y a la etapa de tratamiento de microondas.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 comprende adicionalmente:

clarificar el primer sobrenadante de suero de jugo celular bajo condiciones efectivas para producir un segundo sobrenadante de suero de jugo celular;

25 mezclar un agente de estabilización con el segundo sobrenadante de suero de jugo celular bajo condiciones efectivas para producir una fracción de suero de jugo celular estabilizado,

en el que dicha fracción de suero de jugo celular estabilizado es una fracción bioactiva que está sustancialmente libre de γ -lactonas α -insaturadas, dichas γ -lactonas α -insaturadas comprenden partenolida.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3 comprende adicionalmente:

30 concentrar la fracción de suero de jugo celular estabilizado bajo condiciones efectivas para producir un sobrenadante de suero de jugo celular concentrado.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4 comprende adicionalmente:

mezclar un agente de estabilización con el sobrenadante de suero de jugo celular concentrado bajo condiciones efectivas para producir una fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado,

35 en la que dicha fracción de suero de jugo celular concentrado estabilizado es una fracción bioactiva es decir libre de γ -lactonas α -insaturadas, dichas γ -lactonas α -insaturadas comprenden partenolida.

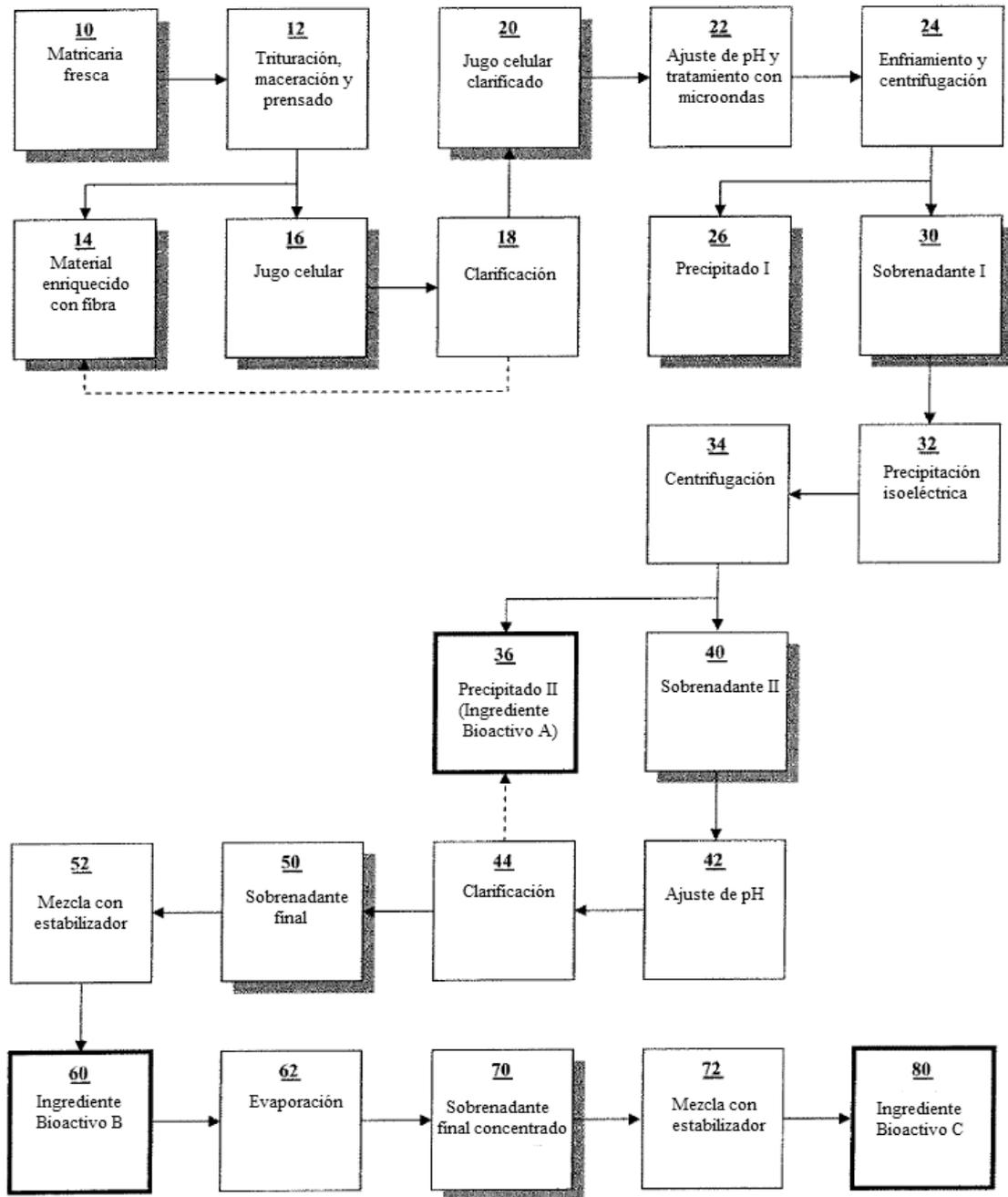


FIG. 1

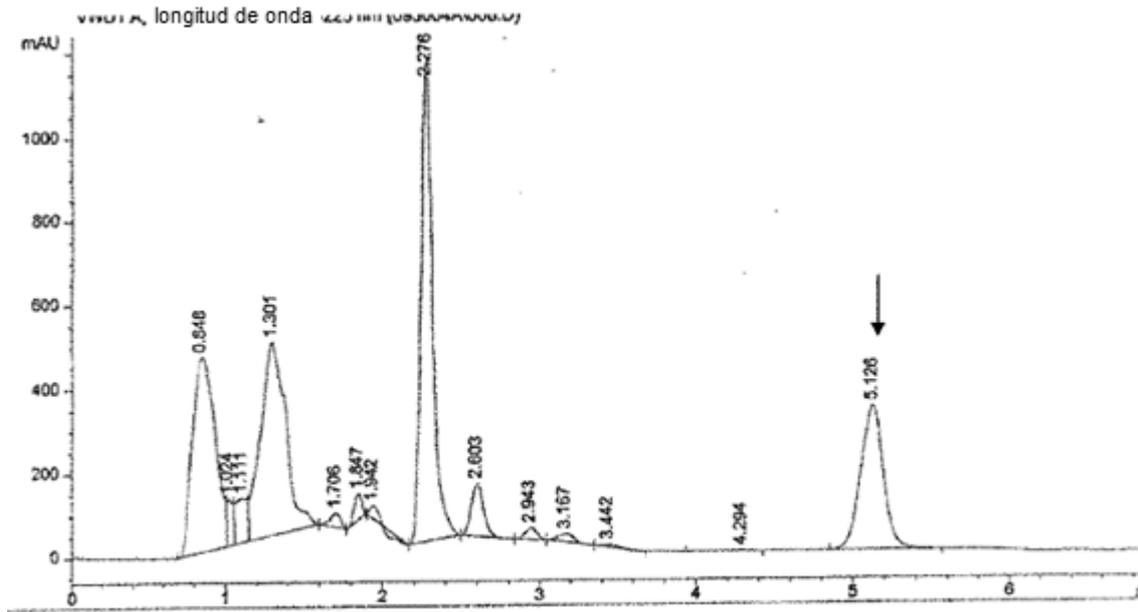


FIG. 2

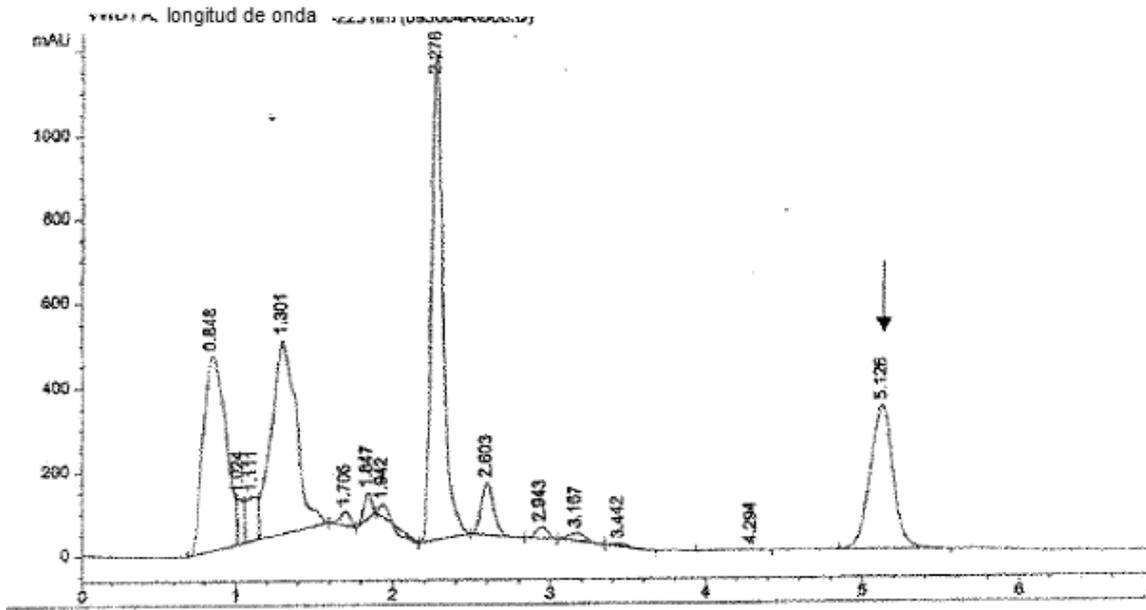


FIG. 3

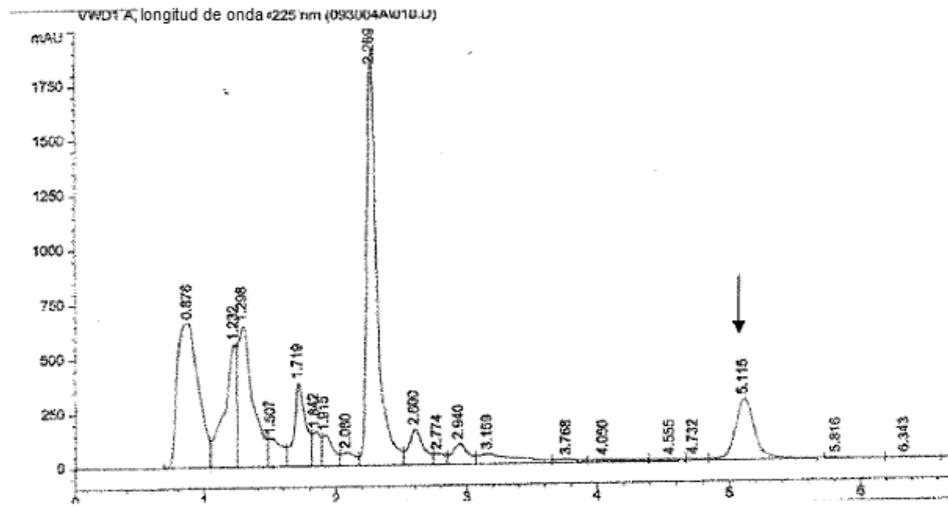


FIG. 4

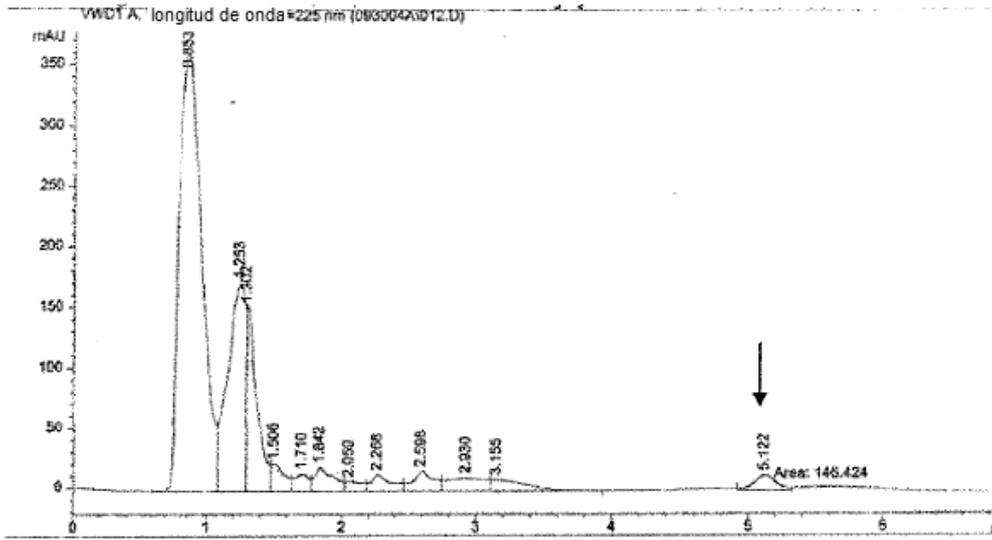


FIG. 5

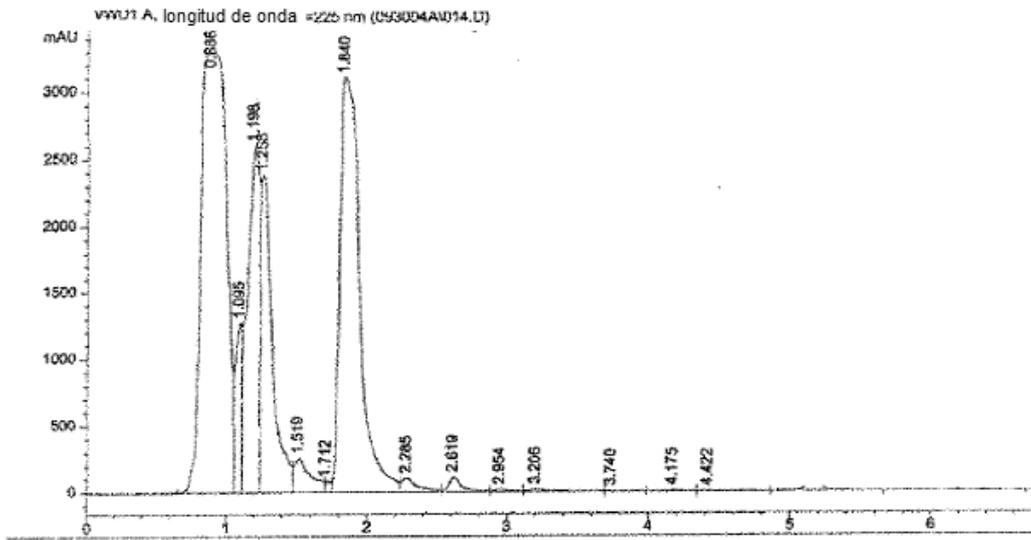


FIG. 6

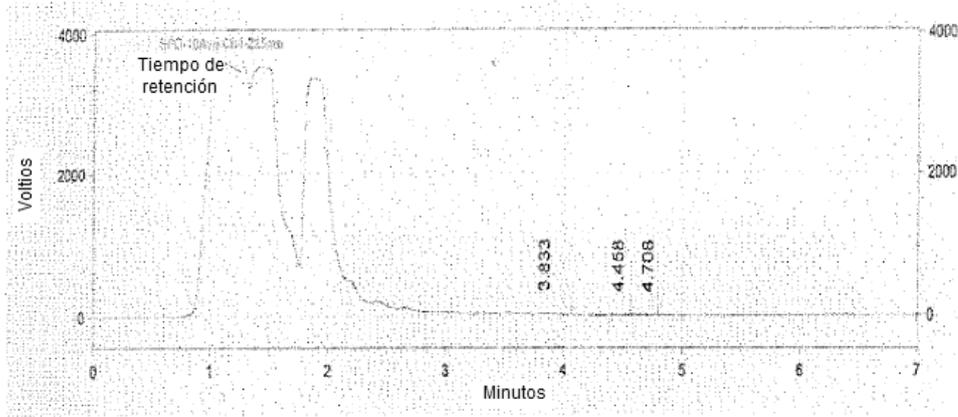


FIG. 7