

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 457**

21 Número de solicitud: 201300600

51 Int. Cl.:

A61K 36/45 (2006.01)

A61K 31/121 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

19.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.07.2015

Fecha de la concesión:

17.12.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

28.12.2015

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)
OTRI - Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias
s/n
41012 Sevilla (Sevilla) ES

72 Inventor/es:

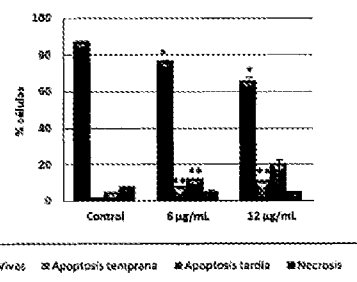
LEÓN GONZÁLEZ, Antonio José;
MARTÍN CORDERO, Carmen;
DÍAZ BARRADAS, María Cruz y
NAVARRO ZAFRA, Inmaculada

54 Título: **Procedimiento de obtención de extractos de hojas de Corema album y su aplicación terapéutica**

57 Resumen:

La presente invención tiene por objeto a un extracto citotóxico procedente de las hojas de Corema album (Ericaceae), así como a sus fracciones y principios activos aislados, que generan especies reactivas de oxígeno (ERO) e inducen apoptosis. También incluye las composiciones farmacológicas que contienen tanto al extracto como a fracciones o principios activos aislados de éste y al uso de estas composiciones en la preparación de medicamentos para la prevención y el tratamiento del cáncer. La presente invención tiene su aplicación en el sector farmacéutico.

Figura 2.



ES 2 540 457 B2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de extractos de hojas de *Corema album* y su aplicación terapéutica

5

Objeto

La presente invención tiene por objeto un extracto de acetato de etilo procedente de las hojas de *Corema album* (L.) D. Don (Ericaceae), con actividad citotóxica, así como a los principios activos aislados del mismo, que generan especies reactivas de oxígeno e inducen apoptosis.

10

La presente invención pertenece al área científica Farmacéutica, dado que establece los métodos de obtención y análisis fitoquímico de extractos de las hojas de *Corema album*, así como fracciones y principios activos aislados y su actividad citotóxica. La industria farmacéutica de productos naturales y la industria agroalimentaria son potenciales usuarios de la presente invención, que podrá aplicarse para el desarrollo de medicamentos, nutracéuticos o alimentos funcionales en el tratamiento y prevención del cáncer.

15

Estado de la técnica

20

El cáncer supone un 12.5% de las muertes en el mundo al año. A pesar de los avances médicos, la tasa de mortalidad no ha sufrido apenas variación en las últimas décadas. La cirugía y la radioterapia han demostrado ser efectivas en las primeras etapas de la aparición del tumor, pero en muchos casos éste no es detectado hasta que ya ha producido metástasis en otros órganos. Entonces, es necesario administrar por vía sistémica agentes quimioterapéuticos que, al producir numerosos efectos adversos, han de administrarse a dosis que resultan ineficaces en muchos casos. Esta ineficacia se refleja en las bajas tasas de supervivencia en pacientes con un cáncer avanzado (Jemal et al., 2011. Glob. Canc.Stat., 61(2), 69-90).

25

30

La baja eficacia de la terapia actual del cáncer en pacientes con metástasis, junto con los efectos adversos y la aparición de tumores resistentes, hace necesario el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. El uso de productos naturales es

especialmente extenso en Oncología, donde, de las 155 moléculas de bajo peso molecular aprobadas entre la década de 1940 y 2006, un 73% estaban relacionadas con productos naturales (Cragg et al., 2009. Chem. Rev. 109(7), 3012-3043).

5 Existe un creciente interés por los extractos vegetales como una alternativa en el tratamiento y prevención de enfermedades neoplásicas ya que en muchos casos se puede disponer de materia prima en cantidad por un menor coste y pueden tener igual o mayor eficacia a los antineoplásicos existentes.

Las chalconas constituyen un importante grupo de compuestos fenólicos que presentan una gran variedad de actividades biológicas, como antioxidante,
10 antiinflamatoria, antibacteriana, citotóxica... Están de manera natural en nuestra dieta y en distintas plantas medicinales, por ejemplo, isoliquiritigenina es abundante en el regaliz, obtenido de la raíz de *Glycyrrhiza glabra*. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la capacidad de las chalconas y sus derivados para inhibir diferentes pasos del desarrollo de la carcinogénesis, y su implicación en los
15 mecanismos de apoptosis de células transformadas y la regulación del ciclo celular, por lo que se presentan como una familia de moléculas con gran potencial en la quimioprevención y tratamiento del cáncer. Entre los mecanismos de acción de las chalconas se encuentra la interacción con los factores de transcripción NF- κ B, STAT3, AP-1, NRF2, PPAR- γ , que regulan la expresión de numerosos genes
20 implicados en el proceso de la carcinogénesis y que forman parte de las rutas de señalización celular en estados de estrés oxidativo e inflamatorio. Además, se ha visto que las chalconas pueden prevenir la etapa de progresión tumoral mediante la activación de la apoptosis, tanto por la vía extrínseca como intrínseca, siendo la proteína antiapoptótica Bcl-2 una de las dianas más frecuentes (Yadav et al., 2011.
25 Int Immunopharmacol, 11(3), 295-309).

Corema album, es una especie perteneciente a la familia Ericaceae, la cual también incluye especies de gran interés agroindustrial, como los arándanos (*Vaccinium sp.*). Crece en los arenales y dunas subcosteras del litoral atlántico de la Península Ibérica. En España aparece en las costas gallegas de La Coruña y Pontevedra y en
30 Andalucía en diferentes puntos del litoral de Huelva y Cádiz. Es un arbusto dioico, de hasta 1m de altura, muy ramificado. Las ramas inferiores son glabras y con numerosas cicatrices foliares; las de los últimos años, densamente tomentosas, con pelos poco ondulados y color grisáceo. Las hojas son xeromórficas, adaptadas al clima seco y miden en torno a 5-6 x 1-2 mm. No existen datos previos publicados

acerca de la composición química o actividad farmacológica de las hojas de esta especie.

Descripción de la invención

5 La presente invención se refiere a la obtención y uso de cualquier extracto, fracción o principio activo aislado de las hojas de *Corema album* (L.) D. Don, Ericaceae, en la prevención y tratamiento de enfermedades neoplásicas; preferentemente el extracto de acetato de etilo que presenta marcada actividad citotóxica en la línea celular HT-29 procedente de adenocarcinoma de colon frente al patrón utilizado 5-fluouracilo (CI_{50} : 15.8 ± 2.6 y 16.2 ± 2.6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

10 La actividad citotóxica mostrada por el extracto en la línea celular HT-29 procedente de adenocarcinoma de colon, se mantiene en las fracciones y los compuestos aislados, 2',4'-dihidroxi-dihidrochalcona (CI_{50} : 1.8 ± 0.4 μM), 2'-metoxi-4'-hidroxidihidrochalcona (CI_{50} : 8.5 ± 2.1 μM) y fracción de pinocembrina y 2',4'-dihidrochalcona (CI_{50} : 6.8 ± 1.2 $\mu\text{g/mL}$) frente al patrón de 5-fluorouracilo (CI_{50} : $8.7 \pm$
15 4.0 μM , 16.2 ± 2.6 $\mu\text{g/mL}$). Por tanto, el extracto, fracciones o los compuestos podrían ser empleados en la terapia antitumoral.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un extracto de las hojas de *Corema album* caracterizado porque se identifican los principios activos 2',4'-dihidroxi-dihidrochalcona, 2'-metoxi-4'-hidroxidihidrochalcona,
20 pinocembrina, 2',4'-dihidrochalcona, ácido ursólico y ácido oleanólico que presentan actividad citotóxica y esta actividad es debida a que generan apoptosis y una parada en el ciclo celular en la fase G2/M.

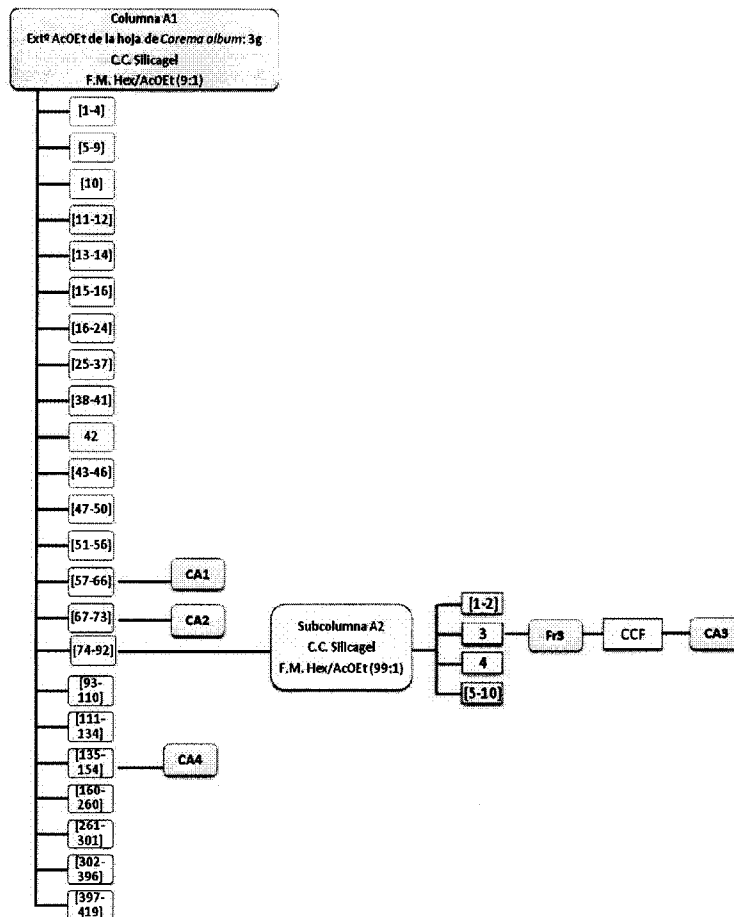
Un segundo aspecto de la presente invención, se refiere a la obtención del extracto que se describe anteriormente, obtenido usando un procedimiento de extracción que
25 comprende los pasos:

- a) Desecar las hojas de *Corema album* a temperatura ambiente
- b) Añadir entre 1 y 10 volúmenes de acetato de etilo u otro disolvente orgánico (p.ej. acetona, hexano, etanol, metanol) o mezcla de solventes a las hojas desecadas
- 30 c) Extraer entre 30 y 120 minutos a temperatura ambiente en baño de ultrasonido. El proceso extractivo descrito puede repetirse si fuese necesario a fin de aumentar el rendimiento. También puede ser extraído por

maceración, percolación o extracción continua.

- d) Finalmente filtrar y concentrar a presión reducida en rotavapor para obtener un extracto seco.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al fraccionamiento y análisis de dicho extracto, caracterizado por la cromatografía del extracto en columna de sílice utilizando como eluyente n-hexano y acetato de etilo en diferentes gradientes. Las fracciones obtenidas fueron agrupadas de acuerdo a su comportamiento cromatográfico (Ver Tabla 1).



10

Tabla 1. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo de la hoja de Corema album. CA1: 2',4'-dihydroxidihydrochalcona; CA2: 2'-metoxi-4'-hidroxidihydrochalcona; CA3: pinocembrina; CA4: 2',4'-dihydrochalcona.

La composición de las fracciones de mayor contenido en compuestos fenólicos es determinada empleando diferentes técnicas analíticas, incluyendo espectrometría de

15

masas y resonancia magnética nuclear.

Por último, el extracto de las hojas de *Corema album*, sus fracciones o principios activos aislados del mismo podrán administrarse en forma de preparado medicamentoso caracterizado por actividad citotóxica. La formulación de los preparados medicamentosos podrá hacerse siguiendo cualquiera de los procedimientos convencionales, pudiendo presentarse en forma de polvo, papeles, granulado, cápsula, sello, pastilla, comprimido, tableta, solución, jarabe, suspensión, tintura o cualquier otra forma farmacéutica. Los preparados farmacéuticos que contengan extractos de hojas de *Corema album* podrán formularse con diferentes vehículos, excipientes y diluyentes a fin de optimizar la administración del mismo por la vía deseada.

Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

15 **Modo de realización de la invención**

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Ejemplo 1: Obtención del extracto, fraccionamiento y análisis químico.

Las hojas de *Corema album* (L.) D. Don fueron recolectadas en el mes de septiembre en la provincia de Huelva. Tras desecarlas a temperatura ambiente, 500 g de hojas fueron sometidas a un proceso de extracción en baño ultrasonido. Se añadieron 1000 mL de acetato de etilo a las hojas desecadas sin triturar y se extrajeron durante 45 minutos a temperatura menor de 40°C en un baño de ultrasonido. Posteriormente se filtró el extracto resultante y se concentró hasta sequedad a presión reducida en rotavapor.

Este extracto se cromatografió en columna de sílice utilizando como eluyente n-hexano y acetato de etilo en diferentes gradientes. Las 419 fracciones de 15 mL obtenidas, fueron agrupadas de acuerdo a su comportamiento cromatográfico (Figura 1), siendo reveladas a la luz UV y con los reactivos óleum y $AlCl_3$.

30 De la reunión de las fracciones [57-66], se aisló por cristalización en metanol un

compuesto en forma de agujas de color amarillo, que fue identificado como 2',4'-dihidroxi-dihidrochalcona.

De las fracciones agrupadas [67-73], se cristalizó en metanol un compuesto en forma de agujas blancas, que fue identificado pinocembrina.

- 5 Reunidas las fracciones [74-92], 500 mg se sometieron nuevamente a una subcolumna de silicagel (Columna A2). La fracción 3 (Fr3), que cristalizó en forma de agujas amarillas. Mediante cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS/MS), se conoció la proporción de la mezcla de dos compuestos: pinocembrina y 2',4'-dihidrochalcona (4:6).
- 10 De la reunión de las fracciones [135-154], cristalizó en metanol un compuesto como agujas blancas, que identificamos como 2'-metoxi-4'-hidroxi-dihidrochalcona.

Todas las sustancias aisladas fueron caracterizadas por sus espectros de masas y RMN. Su determinación estructural se realizó fundamentalmente en base a la aplicación de diversas experiencias de RMN (COSY, NOESY, HSQC y HMBC),
15 habiéndose asignado todas las señales que aparecen en sus espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN.

Ejemplo 2: Determinación de la actividad citotóxica

La actividad citotóxica del extracto de acetato de etilo de las hojas de *Corema album* y los compuestos aislados e identificados fue evaluada por la técnica de la
20 Sulforhodamina B (SRB), presentando un perfil citotóxico similar al del patrón 5-fluorouracilo.

Se siguieron los protocolos establecidos por el NCI, (Monks et al., J. Natl. Cancer Inst. 1991, 83, 757). La línea celular HT-29 de adenocarcinoma de colon fue cultivada en medio RPMI 1640 (Bio Whittaker) que contenía 20% suero bovino fetal, 2 mM L-
25 glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina. El ensayo de citotoxicidad fue realizado utilizando placas de 96 pocillos. Todas las células fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ con 95% de humedad. Las células fueron subcultivadas semanalmente, y el medio de cultivo era renovado dos veces por semana.

30 Los compuestos fueron disueltos inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO), y se prepararon 5 diluciones seriadas logarítmicamente en medio RPMI (Roswell Park

Memorial Institute medium). La concentración final de DMSO nunca fue superior al 0.6%, para evitar la citotoxicidad debida a este disolvente. La dosis máxima ensayada fue de 10^{-4} M para los compuestos puros. Los compuestos no fueron filtrados ni esterilizados ya que la contaminación microbiana se controló por adición
5 de gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al medio. A continuación, se añadió a cada pocillo de las placas incubadas anteriormente, las diferentes disoluciones de los extractos o compuestos puros (100 μL). Posteriormente se incubaron durante 48 h a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5%.

El ensayo de Sulforhodamina B (SRB) fue utilizado en este estudio para determinar
10 la inhibición del crecimiento. Este ensayo colorimétrico estima el número de células de forma indirecta tiñendo las proteínas totales celulares con el colorante SRB.

Las células tumorales fueron fijadas por la adición de 50 μL de ácido tricloroacético frío al 50%, incubándose a 4°C durante una hora. A continuación, las placas se lavaron 5 veces con agua desionizada y se dejaron secar. Posteriormente se
15 adicionó a cada pocillo 100 μL de solución de SRB (0.4% p/v en ácido acético al 1%), incubándose 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron las placas 5 veces con ácido acético glacial al 1% y se dejaron secar. Finalmente las células se solubilizaron en 100 μL de tampón Tris 10 mM, se agitó 5-10 minutos y se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro automático de placa. De
20 forma paralela a este ensayo se realizó una placa control, en la que se realizó esta técnica del SRB una vez realizada la primera incubación.

Finalmente, se calcularon los valores de CI_{50} concentración de extracto o compuesto que produce una inhibición de crecimiento del 50% respecto al control, Tres experimentos diferentes fueron realizados para cada extracto o compuesto. Los
25 datos fueron dados como media de dos o tres experimentos \pm SEM.

Los resultados obtenidos de actividad citotóxica, de los extractos, fracciones y compuestos aislados, se recogen en la siguiente tabla:

	IC ₅₀ (µg/mL)
Extracto AcOEt hojas <i>Corema album</i>	15,8 ± 2,6 µg/mL
2',4'-dihidroxi-dihidrochalcona	0,44 ± 0,1 µg/mL
2'-metoxi-4'-hidroxidi-hidrochalcona	1,8 ± 0,5 µg/mL
Fracción de pinocembrina y 2',4'-dihidrochalcona	6.8 ± 1.2 µg/mL
Patrón 5-fluorouracilo	16.2 ± 2.6 µg/mL

5 Tabla 2: Resultados del ensayo de citotoxicidad (µg/ml) realizado con el extracto, fracción y compuestos aislados de *Corema album* y el fármaco patrón 5-fluorouracilo.

La incubación con agentes antioxidantes, simultáneamente con tratamiento, disminuyó la citotoxicidad de los compuestos ensayados, lo que puso de manifiesto la implicación de la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el mecanismo de citotoxicidad de 2',4'-dihidroxi-dihidrochalcona y 2'-metoxi-4'-hidroxidi-hidrochalcona (Figura 1).

La capacidad de la fracción compuesta por 2',4'-dihidroxi-dihidrochalcona y pinocembrina para inducir apoptosis fue evaluada mediante un kit de Anexina-V unida a isotiocianato de fluoresceína (Anexina V-FITC). Para ello, sembramos 50.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos con un volumen final de 2 mL, e incubamos una noche a 37 °C y 5% de CO₂. Al día siguiente tratamos con 0, 6 y 12 µg/mL de fracción, e incubamos en las mismas condiciones durante 48 horas.

Transcurrido el tiempo de tratamiento, recogimos el medio con células en suspensión, lavamos los pocillos dos veces con tampón fosfato salino (PBS), y recolectamos las células, que estaban adheridas, por tripsinización. Combinamos estas células con las anteriores, centrifugamos y resuspendimos el *pellet* con medio completo. Tras incubar las células durante 30 minutos a 37 °C y 5% de CO₂, centrifugamos y resuspendimos el *pellet* en tampón 1x de Anexina V. A continuación, incubamos 10 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo unido a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Por último se añadió el yoduro de propidio (IP) a

4 °C.

El análisis se realizó en un citómetro de flujo, midiendo la fluorescencia de la suspensión de células con una longitud de onda de excitación de 488 nm, y registrando la emisión de la fluorescencia verde (518 nm) del FITC y la roja (620 nm) del IP. (Figura 2)

El análisis del ciclo celular se realizó por medio del marcaje por fluorescencia de los núcleos de las células en suspensión con yoduro de propidio (IP), y el posterior análisis del contenido de ADN nuclear de cada célula de la población, mediante citometría de flujo. (Núñez, 2001, Curr issues Mol Biol. 3(3), 67-70). Sembramos 50.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos con un volumen final de 2 mL incubamos una noche a 37 °C y 5% de CO₂. Al día siguiente, tratamos con 0, 6 y 12 µg/mL de fracción e incubamos en las mismas condiciones 48 horas.

Transcurrido ese tiempo, recogimos el medio con células en suspensión, lavamos los pocillos dos veces con tampón PBS, y recolectamos las células que estaban adheridas por tripsinización. Combinamos estas células con las anteriores, centrifugamos y resuspendimos el *pellet* en 2 mL de EtOH al 70%. Tras incubación a 4 °C durante 72 horas, se centrifugó y se resuspendió el *pellet* en una solución que contiene IP y ARNasa A, disueltos en PBS. Se incubó una noche a 4 °C y se analizó al día siguiente en un citómetro de flujo, midiendo la fluorescencia de la suspensión de células con una longitud de onda de excitación de 488nm y registrando la emisión de la fluorescencia roja (620nm) del IP (Figura 3).

Descripción del contenido de las figuras

Figura 1. Efecto de los agentes antioxidantes N-acetilcisteína (NAC) y pentacloruro de Manganeso (III) tetrakis (1-metil-4-piridil) porfirina (MnTMPyP) sobre la actividad citotóxica de los flavonoides: 2'-4'-dihydroxidihydrochalcona y 2'-metoxi-4'-hidroxidihydrochalcona. Tras 48 horas de exposición, la viabilidad celular fue determinada mediante el test de SRB. Los resultados se expresan como ($M \pm \delta$, n=3). (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, vs. Control, por t de Student).

Figura 2. Porcentaje de células en apoptosis al tratar las líneas HT-29 con 0 (control), 6 y 12 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción Fr3, aislada de las hojas de Corema album, durante 48 horas. Los resultados se expresan como ($M \pm \delta^2$, n=3). (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, vs. Control, por t de Student)

Figura 3. Porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular al tratar las células HT-29 con 0 (control), 6 y 12 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción Fr3, aislada de las hojas de Corema album, durante 48 horas. Los resultados se expresan como ($M \pm \delta^2$, n=3). (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, vs. Control, por t de Student).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un extracto de las hojas de *Corema album* (L.) D., caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - a) Desechar las hojas de *Corema album* a temperatura ambiente
 - b) Añadir entre 1 y 20 volúmenes de acetato de etilo u otro disolvente orgánico o mezcla de disolventes a las hojas desecadas.
 - c) Extraer entre 30 y 120 minutos a temperatura ambiente en baño de ultrasonido. El proceso extractivo descrito puede repetirse si fuese necesario a fin de aumentar el rendimiento.
 - d) Finalmente filtrar y concentrar a presión reducida en rotavapor para obtener un extracto seco.
2. Procedimiento de obtención de un extracto de las hojas de *Corema album* (L.) D., según reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa c) la extracción se hace por maceración o percolación o extracción continua.
3. Procedimiento de obtención de un extracto de las hojas de *Corema album* (L.) D., según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el extracto de *Corema album* puede ser fraccionado cromatográficamente, manteniendo las fracciones su actividad citotóxica porque contenga algunos de los principios activos
4. Extracto de hojas de *Corema album* (L.) D. obtenido por el procedimiento descrito en las reivindicaciones anteriores, caracterizado por contener los compuestos activos 2',4'-dihydroxidihydrochalcona, pinocembrina, 2',4'-dihydroxichalcona, 2'-metoxi-4'-hidroxidihydrochalcona.
5. Uso del extracto de hojas de *Corema album* (L.) D., según reivindicaciones anteriores, en la preparación de un medicamento con actividad citotóxica, preferentemente en la línea HT-29 de adenocarcinoma de colon humano.
6. Uso del extracto de hojas de *Corema album* (L.) D., según reivindicaciones anteriores, en la preparación de un medicamento para la quimioprevención y el tratamiento del cáncer.

Figura 1.

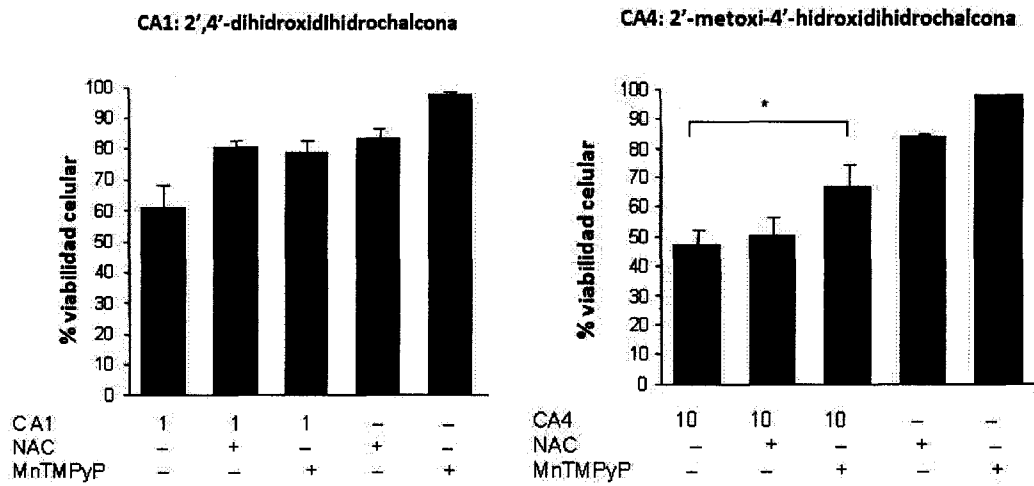


Figura 2.

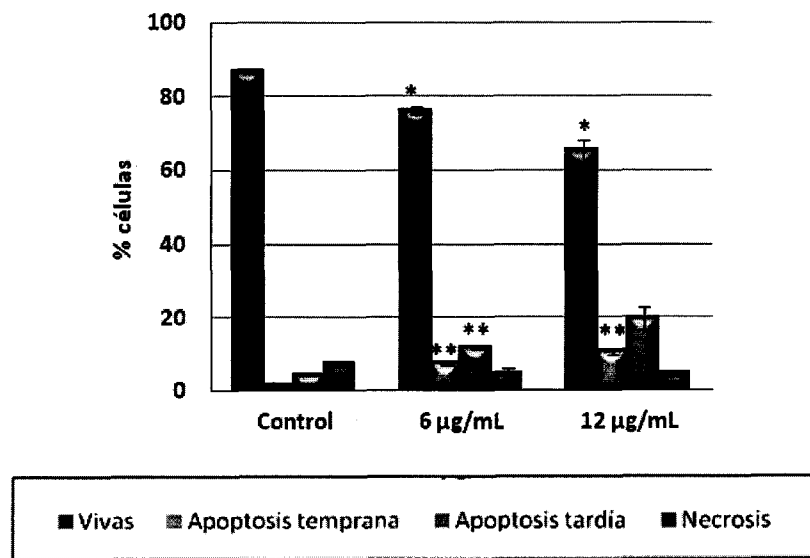
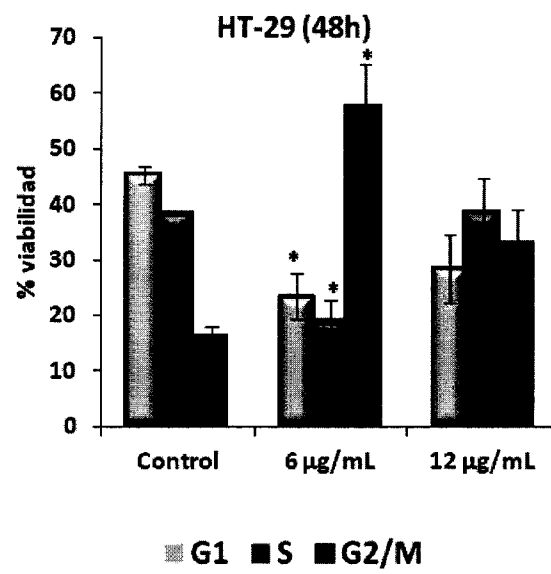


Figura 3.





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201300600

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.06.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LEÓN-GONZÁLEZ, A. J. et al. Chemo-protective activity and characterization of phenolic extracts from <i>Corema album</i> . Food Research International, 2012 Vol. 49, nº 2, páginas 728-738. ISSN 0963-9969 Doi:10.1016/j.foodres.2012.09.016.	1,2
A	LEÓN-GONZÁLEZ, A. J. et al. Phenolic acids, flavonol and anthocyanins in <i>Corema album</i> (L.) D. Don berries. Journal of Food Composition and Analysis, Febrero 2013, vol. 29, nº 1, páginas 58-63. ISSN 0889-1575 Doi:10.1016/j.jfca.2012.10.003.	1
A	FOREJTNIKOVA, H. et al. Chemoprotective and toxic potentials of synthetic and natural chalcones and dihydrochalcones in vitro. Toxicology, 2005. Vol. 208, nº 1, páginas 81-93. ISSN 0300-483X. Doi: 10.1016/j.tox.2004.11.011.	4-6
A	ES 2244075 T3 (INDENA S.p.A.) 01.12.2005, página 2; reivindicaciones 1,4-6.	4-6
A	ES 2181806 T3 (INDENA S.p.A.) 01.03.2003, página 2.	4-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
05.05.2014

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K36/45 (2006.01)
A61K31/121 (2006.01)
A61K31/353 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, X-FULL, NPL, CAPLUS, FSTA, PASCAL, SCISEARCH

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.05.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1 - 6	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1 - 6	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	LEÓN-GONZÁLEZ, A. J. et al. Chemo-protective activity and characterization of phenolic extracts from <i>Corema album</i> . Food Research International, 2012, vol. 49, nº 2, páginas 728-738.	2012
D02	LEÓN-GONZÁLEZ, A. J. et al. Phenolic acids, flavonol and anthocyanins in <i>Corema album</i> (L.) D. Don berries. Journal of Food Composition and Analysis. Febrero 2013, vol. 29, nº 1, páginas 58-63.	Feb. 2013
D03	FOREJTNIKOVA, H. et al. Chemoprotective and toxic potentials of synthetic and natural chalcones and dihydrochalcones in vitro. Toxicology, 2005. Vol. 208, nº 1, páginas 81-93.	2005
D04	ES 2244075 T3 (INDENA S.P.A.)	01.12.2005
D05	ES 2181806 T3 (INDENA S.P.A.)	01.03.2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de obtención de un extracto de las hojas de *Corema album* que comprende las etapas de (reivindicación 1):

- Desecar las hojas de *Corema album* a temperatura ambiente,
- Añadir de 1 a 20 volúmenes de acetato de etilo u otro disolvente orgánico,
- Extraer entre 30 a 120 minutos a temperatura ambiente en baño de ultrasonidos
- Filtrar y concentrar a presión reducida en rotavapor para obtener el extracto seco.

En c) la extracción se hace por maceración o percolación o extracción continua (reiv. 2). El extracto de *Corema album* puede ser fraccionado cromatográficamente, manteniendo las fracciones su actividad citotóxica (reiv. 3) y contiene los compuestos activos 2',4'-dihydroxidihydrochalcona, 2',4'-dihydroxichalcona, 2'-metoxi-4'-hydroxidihydrochalcona y pinocembrina (reiv. 4).

Por último, es objeto de protección el uso del extracto de hojas de *Corema album* en la preparación de un medicamento con actividad citotóxica para línea HT-29 de adenocarcinoma de colon humano (reiv. 5) y para quimioprevención y tratamiento de cáncer (reiv. 6).

Los documentos citados **D01** y **D02** divulgan extractos de frutos de *Corema album* preparados con un procedimiento similar al reivindicado con acetato de etilo y ultrasonidos, si bien los compuestos que se obtienen no son derivados de chalconas mientras que en la solicitud reivindicada se extraen pinocembrina y derivados de hidroxichalconas a partir de extractos de hojas de *Corema album*, por ello los documentos **D01** (páginas 728-737) y **D02** (páginas 58-62) que parten de frutos y no de hojas de *Corema album* no anticipan la invención solicitada.

El documento **D03** se refiere a estudio con 31 chalconas y dihydrochalconas con actividad potencial de quimioprotección, citando entre otras la 2',4'-dihydroxidihydrochalcona reivindicada (páginas 83-91), mientras que los documentos **D04** (página 2, reivindicaciones 1, 4-6) y **D05** (página 2) se refieren a chalconas con actividad antiproliferativa pero ninguno de los documentos **D03-D05** divulgan que dichas chalconas y derivados de chalconas se obtengan de las hojas de *Corema album* por lo que tampoco afectan a la novedad de la invención.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D05, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 6** son nuevas de acuerdo con el Artículo 6 LP 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El procedimiento objeto de la invención de obtener un extracto a partir de las hojas de *Corema album* no resulta evidente para el experto en la técnica puesto que no está divulgado, en los documentos citados **D01** a **D05**, la obtención de ningún extracto a partir de hojas de este subarbusto ni los compuestos de pinocembrina y derivados de hidroxichalconas reivindicados y contenidos en dicho extracto.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D05, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 6** tienen actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86.