



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 258 407**

② Número de solicitud: 200500402

⑤ Int. Cl.:
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **15.02.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

Fecha de la concesión: **22.10.2007**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **16.11.2007**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

⑰ Titular/es: **Universidad de Sevilla**
Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41013 Sevilla, ES

⑱ Inventor/es: **Martín Cordero, Carmen;**
Pedraza Cerbán, M^a Ángeles;
Gálvez Peralta, Marina;
López Lázaro, Miguel y
Ayuso González, M^a Jesús

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Actividad citotóxica de la fracción de acetato de etilo de un extracto obtenido de *Viscum cruciatum* Sieber.**

㉑ Resumen:

Actividad citotóxica de la fracción de acetato de etilo de un extracto obtenido de *Viscum cruciatum* Sieber.

La presente invención tiene por objeto a un extracto de *Viscum cruciatum* Sieber, con actividad citotóxica, así como a los principios activos aislados que son venenos de topoisomerasa II, las composiciones farmacológicas que contienen tanto al extracto como a los principios activos aislados de ésta y al uso de estas composiciones en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. La presente invención tiene su aplicación en el campo de la medicina.

ES 2 258 407 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Actividad citotóxica de la fracción de acetato de etilo de un extracto obtenido de *Viscum cruciatum* Sieber.

5 **Objeto**

La presente invención tiene por objeto a un extracto de *Viscum cruciatum* Sieber, con actividad citotóxica, así como a los principios activos aislados que son venenos de topoisomerasa II, las composiciones farmacológicas que contienen tanto al extracto como a los principios activos aislados de ésta y al uso de estas composiciones en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. La presente invención tiene su aplicación en el campo de la medicina.

Estado de la técnica

15 La familia *Loranthaceae* consta de unas 1500 especies agrupadas en 30-40 géneros, cosmopolita, especialmente distribuida en áreas boscosas tropicales y zonas templadas. Posee una adaptación al parasitismo bastante tolerante. El género *Viscum* consta de 65 especies, localizándose en Europa las especies *Viscum album* L. y *Viscum cruciatum* Sieber.

20 *Viscum album* L. está ampliamente distribuida, y es empleada como antitumoral desde hace tiempo. Están comercializadas como especialidades farmacéuticas dos extractos acuosos (Iscador, Isorel) antitumorales, que presentan como componentes mayoritarios lectinas, péptidos, carbohidratos y alcaloides. La compleja composición que presenta estos extractos acuosos dificultan su estandarización y la localización del principio activo. Esta especie ha sido la más investigada desde el punto de vista farmacológico y su investigación ha sido dirigida fundamentalmente hacia la actividad antitumoral e inmunoestimulante siendo objeto de algunas patentes (WO 01/60389 A2: Mistletoe extracts), así como el aislamiento de lectinas: (KR204365: Extraction method of the pharmaceutical compositions containing *Viscum album* coloratum for immunomodulator and the extracts therein; KR2002007958: Anticancer lectin isolated from *Viscum album* L. var. coloratum, gene thereof and isolating method thereof). También se ha patentado la fracción glicoproteica de *Viscum album* L. var. coloratum con actividad antitumoral (CN1299826: Colored mistletoe herb glycoprotein extraction and its medicine composite and preparation); así como un extracto de *Viscum album* con actividad hipolipemiente (DE 196 39 375 A 1: Mistel-Trockenextrakte). También, Kwaja *et al.* ha publicado que los efectos antitumorales del muérdago coreano, *Viscum album* L. var. coloratum, son debidos a la citotoxicidad que presentan sus alcaloides.

35 *Viscum cruciatum* Sieber, es una planta hemiparásita que crece sobre huéspedes diversos, siendo frecuente encontrarlo sobre almendro, tanto dulce como amargo, espino blanco, olivo, retama y en raras ocasiones sobre hiedra, chopo, fresno, roble y encina. Tiene un área de distribución dispersa, ocupa la zona oriental del mediterráneo (Jerusalem, Gaza, Judea y Samaria) y las zonas más occidentales (Sur de la Península Ibérica y Norte de Africa).

40 En la solicitud de patente WO 01/40188 se describen diarilheptanoides obtenidos de la raíz *Curcuma longa* (curcúmicoides), como inhibidores de VEGF y/o TF en tejidos cancerosos.

Las enzimas llamadas topoisomerasas de ADN modulan el estado topológico del ADN, regulando la estructura superhelicoidal del mismo y jugando un papel muy importante en una gran variedad de procesos biológicos tales como la replicación, la transcripción, la reparación y condensación de los cromosomas y la segregación de las cromátidas hermanas durante la mitosis.

50 Dos clases de topoisomerasas de ADN son reconocidas: Tipo I y Tipo II que catalizan los cambios topológicos en el ADN mediante rotura transitoria de una o de las dos cadenas de la hélice de ADN, respectivamente. La relajación de la doble hélice de ADN es una reacción característica catalizada por la topoisomerasa I (tipo I) mientras que la topoisomerasa II (tipo II) cataliza el paso de dos segmentos de ADN de forma que lleva a cabo reacciones de topoisomerización de ADN como superenrollamiento/relajación, y catenación/decatenación.

55 Las topoisomerasas II de ADN son objetivos quimioterapéuticos por un amplio número de agentes antitumorales, como *epi*-podofilotoxinas (VP-16 o etopósido y VP-26 o tenipósido), antraciclinas, acridinas, antracenedionas y elipiticinas. Estos fármacos estabilizan un complejo covalente intermedio con el ADN y la enzima topoisomerasa II, son capaces de inducir complejos de rotura, convirtiendo a la enzima en un verdadero veneno para la célula. Por ello, estos fármacos son también llamados venenos de topoisomerasa II.

60 Actualmente, los venenos de topoisomerasa II utilizados en clínica están limitados por los efectos secundarios que presentan, por ello es necesario seguir buscando nuevos fármacos venenos de topoisomerasa pero con estructuras nuevas para minimizar estos efectos, bien para ser administrados solos o en combinación con los ya incluidos en terapéutica con el fin de mejorar los protocolos en quimioterapia.

65 En *Phytochemistry* 2001, 58: 567-569 se describen el aislamiento y caracterización de 1,7 di-(3',4'-dihidroxifenil)-4-hepten-3-ona, un diarilheptanoide aislado del extracto metanólico de *Viscum cruciatum*, que presenta una actividad citotoxicidad comparable a la del patrón utilizado etopósido.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

5 Esquema del proceso extractivo.

Figura 2

10 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción de acetato de etilo.

Figura 3

15 Ensayo de formación de “complejos de rotura” con topoisomerasa II por el compuesto V2 y curcumina.

Columna 1: Topo II + ADNpUC19 + 50 μ V2

Columna 2: Topo II + ADNpUC19 + 100 μ V2

20 Columna 3: Topo II + ADNpUC19 + 50 μ Curcumina

Columna 4: Topo II + ADNpUC19 + 100 μ Curcumina

Columna 5: Topo II + ADNpUC19 + 100 μ Etopósido

25 Columna 6: Topo II + ADNpUC19

Columna 7: AND superenrollado (ADNpUC19)

Columna 8: AND lineal

30

Figura 4

Cuantificación de los complejos de rotura de ADN inducidos por los venenos de topoisomerasa.

35 Columna 1: V2 (50 μ M); columna 2: V2 (100 μ M); columna 3: Curcumina (50 μ M); columna 4: Curcumina (100 μ M); columna 5: etoposido (100 μ M).

Descripción de la invención

40 La presente invención se refiere, al empleo como antitumoral de una fracción de acetato de etilo a partir de un extracto metanólico de hojas y tallos de *Viscum cruciatum* Sieber, que presenta marcada actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales humanas: TK-10 adenocarcinoma renal, MCF-7 adenocarcinoma mamario y UACC-62 melanoma (CI₅₀ :19.5 , 5.3 y 4.1 μ g/mL respectivamente). También abarca su obtención, fraccionamiento, aislamiento e identificación de los compuestos activos mediante ensayos de citotoxicidad biodirigidos. La actividad citotóxica mostrada por el extracto se mantiene en los compuestos aislados, 1-(3',4'-dihidroxifenil)7-(4'-hidroxifenil)-4-hepten-3-ona (V₁) (CI₅₀ :7.5, 6.9 y 8.4 μ g/mL respectivamente) y 1,7 di-(3',4'-dihidroxifenil)-4-hepten-3-ona (V2) (CI₅₀ : 2.6, 0.9 y 1.1 μ g/mL).

50 El extracto de acetato de etilo y los compuestos aislados presentan actividad citotóxica en las células tumorales humanas: TK-10 adenocarcinoma renal, MCF-7 adenocarcinoma mamario y UACC-62 melanoma. Por tanto, el extracto como los compuestos podrían ser empleados en la terapia antitumoral.

55 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un extracto de *Viscum cruciatum* Sieber, caracterizado porque se identifican los principios activos, que presentan actividad citotóxica y esta actividad es debida a que se comportan como venenos de topoisomera II, induciendo complejos de rotura tóxicos para la célula.

De acuerdo con una realización preferida, dicho extracto es la fracción de acetato de etilo a partir de un extracto metanólico.

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

- a) someter a un proceso de extracción continua en caliente con metanol las sumidades de *Viscum cruciatum* Sieber recolectadas previamente;
- 65 b) concentrar a presión reducida;
- c) resuspender el residuo en agua; y

ES 2 258 407 B1

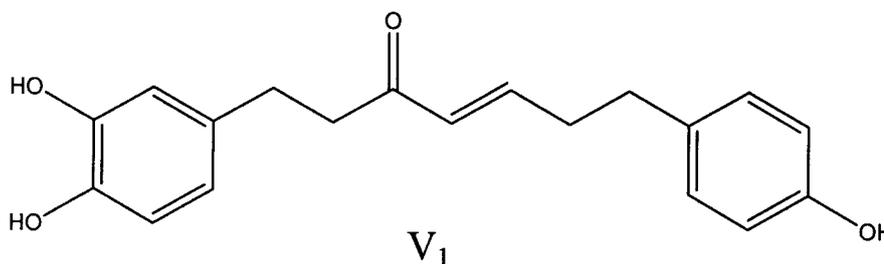
d) someter a extracción líquido-líquido con disolventes de polaridad creciente.

De acuerdo con una realización preferida, en el paso d) se emplean como disolventes cloroformo, acetato de etilo y butanol. En una realización más preferida, la fracción de acetato de etilo se cromatografía utilizando como eluyentes n-hexano-acetato de etilo en diferentes gradientes.

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un extracto con actividad citotóxica de *Viscum cruciatum* Sieber obtenido como se describe arriba, para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. La composición además comprende al menos un compuesto terapéutico adicional. En una realización más preferida, dicho compuesto terapéutico adicional es un agente antitumoral.

La presente invención se refiere al uso de un extracto activo como se describe anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Este cuarto aspecto de la invención puede ser formulado como un método de tratamiento del cáncer que comprende la administración a un individuo en necesidad de dicho tratamiento de una composición farmacéutica como se describe anteriormente.

Por último, con la presente invención se obtiene el compuesto 1-(3',4'-dihidroxifenil)7-(4'-hidroxifenil)-4-hepten-3-ona (V₁), aislado de la fracción de acetato de etilo descrita anteriormente, cuya fórmula es



Viscum cruciatum Sieber es una especie hemiparásita que crece sobre huéspedes diversos, siendo frecuente encontrarlo sobre almendro, tanto dulce como amargo, espino blanco, olivo, retama y en raras ocasiones sobre hiedra, chopo, fresno, roble y encina. Los extractos se pueden preparar a partir de especies recolectadas sobre cualquier huésped.

Las sumidades de *Viscum cruciatum* fueron recolectadas sobre la especie *Retama sphaerocarpa Boissier*, en el mes de Enero en la provincia Cádiz. Desecadas a temperatura ambiente, fueron sometidas a un proceso de extracción continua en caliente en un dispositivo tipo Soxhlet con metanol, posteriormente se concentró a presión reducida. El residuo se resuspendió en agua y se sometió a extracción líquido-líquido con disolventes de polaridad creciente, cloroformo, acetato de etilo y butanol, obteniéndose las correspondientes fracciones: clorofórmica, acetato de etilo y butanólica (Figura 1).

Se realizó un estudio biodirigido utilizando un ensayo de citotoxicidad, los resultados del mismo se recogen en la Tabla 1.

Se seleccionó la fracción de acetato de etilo. Esta fracción se cromatografió en columna de sílice utilizando como eluyentes n-hexano-acetato de etilo en diferentes gradientes, las fracciones obtenidas fueron agrupadas de acuerdo a su comportamiento cromatográfico (Figura 2), y sometidas a los ensayos de citotoxicidad (Tabla 2).

De las fracciones activas se aislaron dos compuestos (V₁ y V₂) (Figura 3) que fueron identificados por diferentes métodos espectroscópicos:

V₁: 1-(3',4'-dihidroxifenil)7-(4''-hidroxifenil)-4-hepten-3-ona. sólido siruposo, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3420 (OH), 1650 (C=C-CO), 1595 (C=C). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 2.51 (2H, *m*, H-6), 2.61 (2H, *m*, H-7), 2.74 (4H, *m*, H-1, H-2), 6.06 (1H, *d*, *J*_{4,5} = 16 Hz, H-4), 6.48 (1H, *dd*, H-6'), 6.61 (1H, *d*, *J*=2, H-2'), 6.66 (1H, *d*, *J*=8, H-5'), 6.69 (2H, *d*, *J*=8, H-3'', H-5''), 6.86 (1H, *dt*, *J*=5, 16 Hz, H-5), 6.98 (2H, *d*, *J*=8, H-2'', H-6''), ¹³C NMR (50 MHz, CD₃OD): δ 31.1 (C-1), 35.9 (C-6), 34.7 (C-7), 42.8 (C-2), 116.3 (C-3''), 116.5 (C-5'), 116.7 (C-2'), 120.8 (C-6'), 130.5 (C-2'', C-6'') 131.8 (C-4), 133.2 (C-1''), 134.2 (C-1'), 144.6 (C-4'), 146.3 (C-3'), 149.4 (C-5), 156.8 (C-4''), 203.1 (C-3). EM *m/e* (int. rel. %) [M⁺] 312.1364 (calcd. para C₁₉ H₂₀O₄ 312.1361) 294 (1), 205 (1), 191 (3), 180(10), 175(3), 137 (8), 123 (100), 107 (84), 77 (37).

V₂: 1,7 di-(3',4'-dihidroxifenil)-4-hepten-3-ona, sólido siruposo, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3350, 3050, 2920, 1650, 1510. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 2.43-2.78 (8H, *m*, H-6, H-7, H-1, H-2), 6.05 (1H, *d*, *J* = 16.8 Hz, H-4), 6.45-6.69 (6H, *m*, H-6', H-6'', H-2', H-2'', H-5', H-5''), 6.86 (1H, *dt*, *J* = 6.5, 16.8Hz, H-5). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 30.02 (C-1), 34.9 (C-6), 34.2 (C-7), 42.1 (C-2), 116.0 (C-5''), 116.2 (C-2', C-2''), 118.2 (C-6', C-6''), 143.8 (C-4', C-4''), 145.5 (C-3', C-3''), 147.6 (C-6), 200.3 (C-3). EM *m/e* (int. rel. %) [M⁺] 328.1307 (calcd. para C₁₉ H₂₀O₅ 328.1310) 328 (55), 206 (19), 191 (18), 149(58), 148(38), 137 (28), 136 (28), 123 (100), 107 (22), 91 (36), 77 (58).

ES 2 258 407 B1

Estos dos compuestos aislados e identificados fueron sometidos a los mismos ensayos de citotoxicidad, presentando un perfil citotóxico en las líneas celulares ensayadas similar al del patrón etopósido. Por ello, encaminamos su posible mecanismo de acción hacia la actividad veneno de topoisomerasa II.

- 5 El estudio biodirigido mediante ensayos de citotoxicidad puede ser determinado por métodos farmacológicos, conocidos por el experto en la materia, la técnica utilizada recomendada por el NCI se describe a continuación (técnica A).

Técnica A

10

- *Ensayo de Citotoxicidad*

El ensayo de citotoxicidad fue realizado utilizando el método SRB.

15

Las tres líneas tumorales humanas empleadas en este experimento fueron: adenocarcinoma renal humano (TK-10), adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), melanoma humano (UACC-62). La citotoxicidad fue determinada siguiendo los protocolos establecidos por el NCI, (Monks, A. *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 1991, 83, 757). Las líneas TK-10, MCF-7, UACC-62 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Bio Whittaker) que contenía 20% suero bovino fetal, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomycin. El ensayo de citotoxicidad fue realizado utilizando 20 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. De acuerdo con sus perfiles de crecimiento, se determinaron las densidades óptimas de sembrado para cada línea celular (15x10³, 5x10³ y 100x10³ células/pocillo para TK-10, MCF-7 y UACC-62, respectivamente).

25

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

30

Los compuestos fueron disueltos inicialmente en DMSO, y se prepararon 5 diluciones seriadas logarítmicamente en medio RPMI. 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 de gentamicina (50 µg/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 CO₂ al 5%.

35

- *Técnica de la sulforodamina B (SRB)*

40

Las células tumorales suspensión, 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 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 forma paralela a este ensayo se 45 realizó una placa control, en la que se realizó esta técnica del SRB una vez realizada la primera incubación.

45

50

Finalmente, se pueden calcular los valores de IC₅₀ concentración de extracto o compuesto que produce una inhibición de crecimiento del 50% respecto al control, ITC, concentración que inhibe totalmente el crecimiento y LC₅₀, concentración que produce una muerte celular neta en el 50% de la población de células de cada línea celular. Dos o tres experimentos diferentes fueron realizados para cada extracto o compuesto. Los datos fueron dados como media de dos o tres experimentos ± SEM.

55

Los resultados obtenidos de actividad citotóxica en el estudio biodirigido, de los extractos, fracciones y compuestos aislados, utilizando la técnica A se recogen en las tablas 1, 2 y 3.

55

60

65

ES 2 258 407 B1

TABLA 1

Resultados del ensayo de citotoxicidad ($\mu\text{g/ml}$) realizado con los diferentes extractos y fracciones de Viscum cruciatum Sieber

	TK-10			MCF-7			UACC-62		
	IC ₅₀	ITC	LC ₅₀	IC ₅₀	ITC	LC ₅₀	IC ₅₀	ITC	LC ₅₀
Extracto Metanolico	32.3	128.9	>250	40.3	96.5	230.5	19.6	55.7	158.0
Fracción Cloroformica	106.8	>250	>250	22.7	>250	>250	41.6	224.7	>250
Fracción Acetato etilo	19.5	163.7	>250	5.3	41.8	>250	4.1	9.8	23.0
Fracción Butanólica	44.4	>250	>250	35.8	61.4	105.3	55.0	95.5	166.0

TABLA 2

Resultados del ensayo de citotoxicidad ($\mu\text{g/ml}$) de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto acetato de etilo

	TK-10			MCF-7			UACC-62		
	IC ₅₀	ITC	LC ₅₀	IC ₅₀	ITC	LC ₅₀	IC ₅₀	ITC	LC ₅₀
Extracto Acetato de etilo	19.5	163.7	>250	5.3	41.8	>250	4.1	9.8	23.0
Fraccionamiento Cromatográfico Acetato de Etilo									
[2-9]	91.5	250	>250	28.6	63.2	140.0	37.1	72.3	141.0
[13-14]	185.9	>250	>250	46.4	131.5	>250	53.8	96.5	172.9
[21-22]	7.5	28.2	106.0	6.9	27.3	108.2	8.4	23.9	67.9
[30-35]	5.7	13.8	33.4	2.6	7.0	19.1	9.2	8.4	16.8
[45-60]	27.5	57.9	122.3	7.8	30.4	118.9	4.7	8.8	16.4
[70-79]	38.6	75.0	145.8	7.2	22.2	68.4	7.0	17.3	42.4
[80-85]	51.3	126.1	>250	17.1	81.3	>250	10.6	43.6	178.7
[86-91]	39.1	76.8	150.6	9.6	56.2	>250	11.4	47.2	196.0
[95-99]	98.7	>250	>250	22.0	>250	>250	32.0	69.5	151.4
[100-110]	63.9	>250	>250	16.0	>250	>250	30.0	67.2	151.2

ES 2 258 407 B1

TABLA 3

Resultados del ensayo de citotoxicidad ($\mu\text{g/ml}$) de los compuestos aislados

	TK-10			MCF-7			UACC-62		
	IC ₅₀	ITC	LC ₅₀	IC ₅₀	ITC	LC ₅₀	IC ₅₀	ITC	LC ₅₀
V ₁	7.5	28.2	106.0	6.9	27.3	108.2	8.4	23.9	67.9
V ₂	2.6	26.8	>32.8	0.9	4.2	18.2	1.1	3.3	9.9
Etopósido	9.95	52.4	>58.8	0.87	>58.8	>58.8	1.1	13,3	>58.8

La capacidad del compuesto mayoritario del extracto V₂ para estabilizar el complejo rotura topoisomerasa II-ADN puede ser determinada mediante métodos farmacológicos que son bien conocidos en el campo de la técnica, la técnica utilizada se describe a continuación (Técnica B).

Técnica B

- Ensayo de venenos de topoisomerasa II

La topoisomerasa II relaja el ADN superenrollado produciendo cortes transitorios en una o dos cadenas de dicha molécula. En el transcurso de esta operación se forma un complejo covalente entre el ADN y la topoisomerasa, que contiene al ADN circular abierto, y el ADN lineal que pueden ser detectados. Sin embargo, la vida media de estos complejos es relativamente corta, por lo que en condiciones normales no se consiguen detectar, a no ser que sean estabilizados por agentes que actúen como venenos de topoisomerasas, como es el caso del etopósido.

- Determinación de "complejos de rotura" del ADN mediante electroforesis

Este ensayo está basado en la capacidad de las topoisomerasas II de formar complejos de rotura con el ADN, que pueden ser detectados mediante electroforesis y cuantificados por densitometría. Para ello preparamos la siguiente mezcla de reacción : 0.25 μg de ADN superenrollado, 2 μL de tampón de reacción (pH 8, ATP 0.5 mM), compuesto problema, 4 unidades de Topo II y H₂O destilada hasta completar un volumen final de 20 μL , que dejamos incubar a 37°C durante 30 min. A continuación, finalizamos la reacción mediante la adición de 2 μL de SDS (dodecil sulfato sódico) al 10%, utilizando 2 μL de proteinasa K (2 $\mu\text{g/ml}$), para desnaturalizar la Topo II, durante 15 min. de incubación a 37°C. Las muestras fueron extraídas con una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1) y 2 μL de azul de bromofenol y cargadas sobre un gel de agarosa al 1%.

La electroforesis se realizó a 1.5 V/cm durante 6 h en un tampón Tris-acetato-EDTA con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g/ml}$). Los geles de agarosa fueron fotografiados bajo una fuente de luz ultravioleta, determinándose cuantitativamente la actividad de las topoisomerasas por densitometría mediante videoimpresión, usando el software PCBAS. Los resultados fueron expresados como porcentaje de "complejos de rotura" en relación con el ADN total. Utilizamos como fármaco patrón etopósido (Figuras 4 y 5).

Estandarización de la fracción acetato de etilo: Se ha realizado mediante un equipo HPLC constituido por bomba modelo 515 (Waters), detector UV-Vis modelo Lambda Max 481 (Waters), registrador e integrador modelo 745 (Waters) y controlador automático de gradiente (Waters). Las condiciones experimentales utilizadas han sido: fase A: agua (con 2,5% de ácido acético) y fase B: acetonitrilo. La elución se desarrolló, utilizando mezcla A:B (65:35); flujo 0.8 mL/min, $\lambda=280$ nm.

La fracción de acetato de etilo que presenta actividad citotóxica en las tres líneas celulares tumorales contiene 13.0 \pm 2.2% en V₁ (1-(3',4'-dihidroxifenil)7-(4'-hidroxifenil)-4-hepten-3-ona) y 26,9 \pm 2.2% en V₂ (1,7 di-(3',4'-dihidroxifenil)-4-hepten-3-ona), estas proporciones pueden variar dependiendo del hospedador, época de recolección, etc, siendo la relación aproximada de V1 con respecto V2, 1:2.

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

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de obtención de un extracto de *Viscum cruciatum* Sieber con actividad citotóxica, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) recolección y desecación a temperatura ambiente de hojas y tallos de *Viscum cruciatum* Sieber,
- b) extracción continua en caliente durante 48 horas utilizando metanol como disolvente,
- 10 c) concentración mediante filtración y evaporación del extracto metanólico a presión reducida,
- d) resuspensión acuosa del residuo y extracción líquido-líquido utilizando disolventes de polaridad creciente.

15 2. Procedimiento de obtención de un extracto de *Viscum cruciatum* Sieber según reivindicación 1, **caracterizado** porque en la extracción líquido-líquido se agota en cloroformo y posteriormente se emplea acetato de etilo.

20 3. Extracto de *Viscum cruciatum* Sieber, obtenido según el procedimiento descrito en las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por contener dos compuestos activos 1-(3',4'-dihidroxifenil)7-(4'-hidroxifenil)-4-hepten-3-ona (V_1) y 1,7 di-(3',4'-dihidroxifenil)-4-hepten-3-ona (V_2), con una relación V_1 con respecto a V_2 , 1:2.

4. Extracto de *Viscum cruciatum* Sieber obtenido según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por poseer marcada actividad citotóxica en líneas celulares tumorales humanas.

25 5. Extracto de *Viscum cruciatum* Sieber obtenido según el procedimiento descrito en las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque sus principios activos tienen actividad citotóxica en líneas celulares tumorales humanas y el mayoritario (V_2) es un veneno de topoisomerasa II.

30 6. Uso del extracto de *Viscum cruciatum* Sieber obtenido según reivindicaciones anteriores, en la preparación de un medicamento para la prevención y el tratamiento del cáncer.

35

40

45

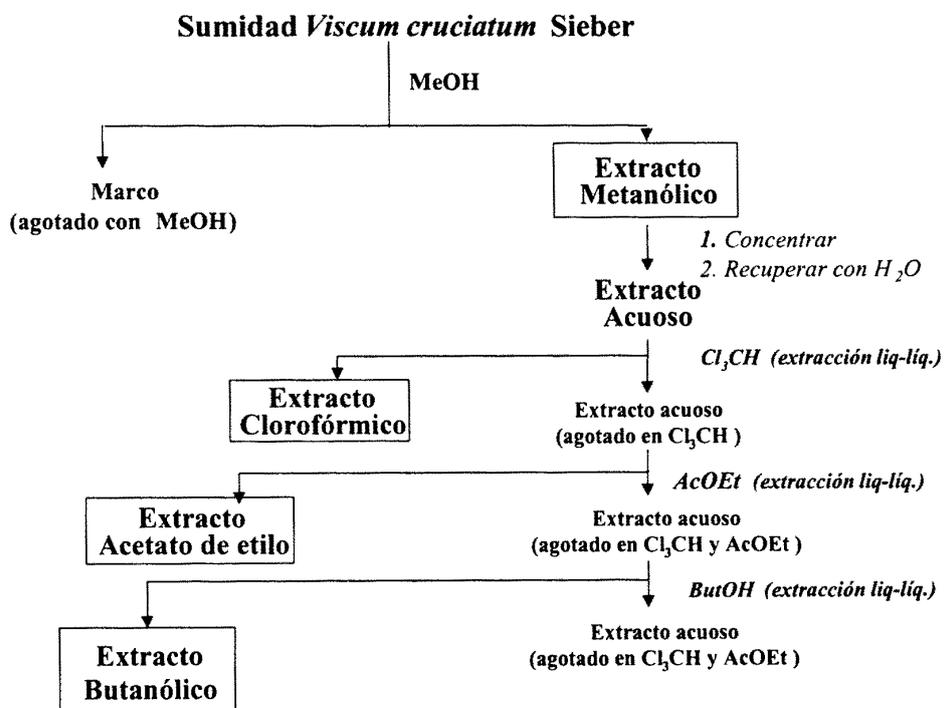
50

55

60

65

FIG. 1 : Esquema del proceso extractivo



Extracto Acetato de etilo

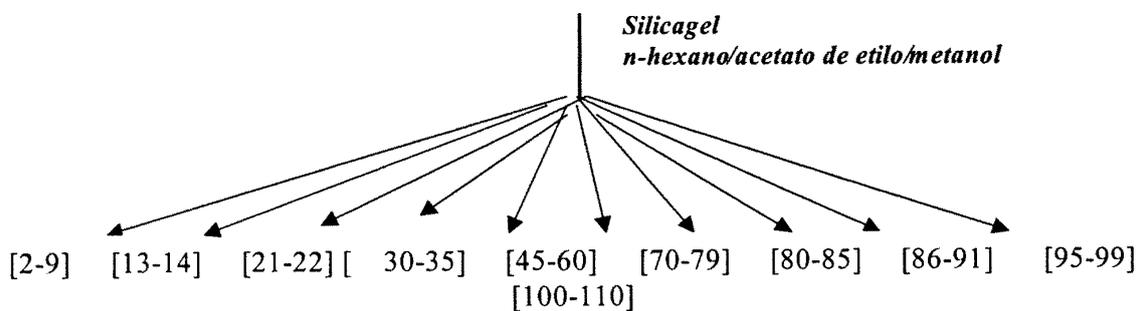


FIG. 2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto Acetato de Etilo

FIG. 3.-Ensayo de formación de “complejos de rotura” con topoisomerasa II por el compuesto V₂ (hirsutanona) y curcumina .

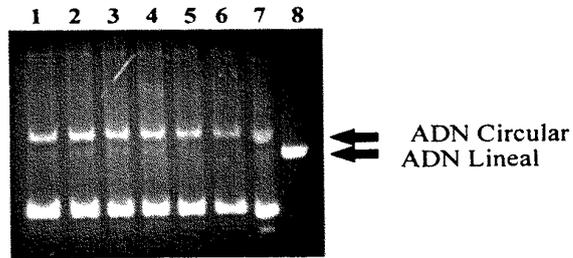
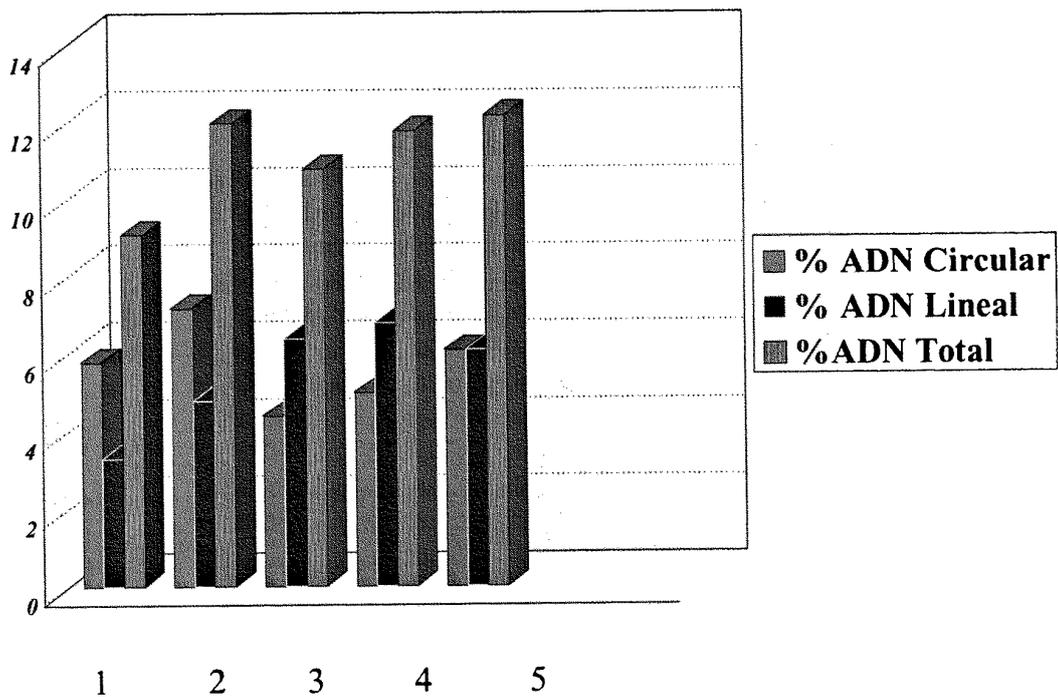


FIG.4.-Cuantificación de los complejos de rotura de ADN inducidos por los venenos de topoisomerasa





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 258 407

② Nº de solicitud: 200500402

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.02.2005

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 36/185** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MARTIN-CORDERO, C. et al. "A cytotoxic diarylheptanoid from <i>Viscum cruciatum</i> " <i>Phytochemistry</i> , 2001. Vol. 58, nº 4, páginas 567-569.	1-6
X	GOMEZ, M.A. et al. Cytostatic activity against HEP-2 cells of methanol extracts from <i>Viscum cruciatum</i> Sieber parasitic on <i>Crataegus monogyna</i> Jacq. and two isolated principles". <i>Phytotherapy Research</i> , 1997. Vol. 11, nº 3, páginas 240-242.	1,2,4,6
A	SAENZ, M. T. et al. "Extracts from <i>Viscum</i> and <i>Crataegus</i> are cytotoxic against larynx cancer cells". <i>Zeitschrift für Naturforschung, Section C. Journal of Biosciences</i> , 1997. Vol. 52, nº 1-2, páginas 42-44.	1,4,6
A	AHUMADA, C. et al. "Influence of the parasite <i>Viscum cruciatum</i> Sieber on the chemical constituents of <i>Crataegus monogyna</i> Jacq". <i>Zeitschrift für Naturforschung, C: Journal of Biosciences</i> , 2001. Vol. 56, nº 11-12, páginas 1091-1094.	1,3,4
A	GOMEZ, M. A. et al. "Effect of methanolic extract of parasitic <i>Viscum cruciatum</i> Sieber on mitosis in <i>Allium cepa</i> L.". <i>Cytobios</i> , 1996. Vol. 85, nº 340, páginas 59-63.	

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 10.02.2006	Examinador Asha Sukhwani	Página 1/1
-------------------------------------------------------	------------------------------------	----------------------