

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 360 547**

21 Número de solicitud: 200930942

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/4375 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **02.11.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.06.2011

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

72 Inventor/es: **Herraiz Tomico, Tomás;**
González Peña, Diana;
Arán Redó, Vicente Jesús y
Guillén Fuerte, Hugo

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Procedimiento de obtención de los alcaloides activos de la planta medicinal *Peganum harmala* y su uso.**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de los alcaloides activos de la planta medicinal *Peganum harmala* y su uso.

La presente invención describe un procedimiento para la obtención de los principios activos responsables de la actividad biológica y farmacológica de la planta medicinal *Peganum harmala*, mediante un procedimiento que consiste en una extracción selectiva de los alcaloides quina-zolínicos (peganina o vasicina, deoxipeganina y glicósido de peganina) y beta-carbolínicos (harmalina y harmina). Los alcaloides aislados puros, en extractos y/o las fracciones enriquecidas de éstos, obtenidas desde distintas partes de la planta pueden ser utilizados en preparados farmacéuticos, cosméticos, nutracéuticos, productos naturales o preparados de herbolario y como remedio natural para el tratamiento de distintas patologías en las que se utilizan la planta medicinal *P. harmala* como los problemas o enfermedades respiratorias, infecciosas, neurodegenerativas, y cáncer. El procedimiento fracciona o purifica los principios activos evitando interacciones indeseables y aumentando la selectividad y seguridad de los extractos medicinales de *P. harmala*.

ES 2 360 547 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de los alcaloides activos de la planta medicinal *Peganum harmala* y su uso.

5 Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector químico y describe un procedimiento mejorado de producción y obtención de los principios activos de la planta medicinal *P. harmala*: alcaloides quinazolínicos (peganina -vasicina-, deoxipeganina y glicósido de peganina) y alcaloides beta-carbolina, harmalina y harmina para su uso en preparados farmacéuticos, cosméticos, parafarmacia, nutracéuticos y/o productos de herbolario para su uso como remedio natural o en el tratamiento de patologías en las que se utiliza tradicionalmente esta planta medicinal (por ej. enfermedades respiratorias, neurológicas, infecciones, antiparasitarias, antiprotozoarias) o como remedio natural en otros tratamientos dermatológicos (calvicie).

15 Estado de la técnica

Peganum harmala L. es una planta medicinal utilizada desde muy antiguo en distintas partes del mundo como remedio natural eficaz para el tratamiento de distintas patologías por sus propiedades farmacológicas y psicoactivas (análogo de *Ayahuasca*). *P. harmala* L. (*Zygophyllaceae*) (Syrian rue, harmal, harmel) es una planta perenne herbácea nativa de terrenos áridos del norte de África, región mediterránea, oriente medio, Paquistán, India y China y que se ha introducido y naturalizado en partes de sudoeste de EEUU, Sudáfrica y Australia. La ingestión de sus semillas poseen efectos hipotérmicos, y propiedades alucionógenas y se utiliza como remedio medicinal, incienso, especia y condimento. Tiene actividad como agente abortivo, narcótico, afrodisíaco, estimulante, sedativo, emenagogo, emético, y para el tratamiento de sífilis, fiebre, histeria, malaria, neuralgia, parkinsonismo, reumatismo, cólico, asma y enfermedades respiratorias y oculares (Berrougui *et al.*, 2006, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58, 967-974; Abdelfattah *et al.*, 1995, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52, 421-426; Astulla *et al.*, 2008, *Journal of Natural Medicines*, 62, 470-472; Elbahri and Chemli, 1991, *Veterinary and Human Toxicology*, 33, 276-277. Farouk *et al.*, 2008, *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 449-454.; Mahmoudian *et al.* (2002) *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 1, 1-4; Im *et al.*, 2009, *Vascular Pharmacology*, 50, 147-152.; Shahverdi *et al.*, 2008, *Pharmacognosy Magazine*, 4, 236-240.; Monsef *et al.*, 2004, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7, 65-69). Extractos de *P. harmala* también son útiles contra la caída del cabello (Imad y col, patente FR2912914). Estudios recientes han demostrado que los extractos de *P. harmala* también tienen actividad como fungicida, bactericida y antitumoral (Sobhani *et al.*, 2002, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 19-23; Lamchouri *et al.*, 1999, *Thérapie*, 54, 753-758.; Song *et al.*, 2004 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, 128-132; Luay, 2003, patente NZ522055 y Suo Huazhong, 2001, patente CN1299664; Ismail, patente WO9924048).

Además de sus efectos farmacológicos, los extractos de *P. harmala* pueden ocasionar efectos toxicológicos moderados. Una sobredosis ingerida de *P. harmala* puede producir casos de intoxicación con parálisis, euforia, convulsiones, alucinaciones, problemas digestivos (nauseas, vómitos), hipotermia y bradicardia (Frison *et al.*, 2009, *Forensic Science International*, 179, e37-e43; Ben Salah *et al.*, 1986, *Essaydali Scietifique*, 21, 13-18). Estos efectos, son moderados y los síntomas remiten a las pocas horas de cesar en la ingestión. Preparaciones de la planta pueden mostrar efectos psicofarmacológicos potentes y pueden afectar a la enzima monoamino oxidasa (MAO) con la posibilidad de producir interacciones con alimentos y generar crisis hipertensivas debido a la presencia de aminas vasoactivas. Estos datos demuestran la necesidad de una caracterización y separación de los distintos principios activos de la planta ya que éstos conjuntamente pueden producir efectos contrarios e interacciones indeseables, impidiendo el uso racional de esta planta medicinal en distintas patologías. Una caracterización, fraccionamiento y purificación de los principios activos puede permitir la obtención de resultados mejores y más selectivos sobre los efectos farmacológicos buscados evitando posibles acciones toxicológicas secundarias.

Peganum harmala L. contiene diversos principios activos útiles en el tratamiento de enfermedades. Las propiedades farmacológicas de *P. harmala* se atribuyen principalmente a su contenido en alcaloides β -carbolínicos y quinazolínicos que son los principales principios activos de *P. harmala*. Los alcaloides β -carbolinas son sustancias psicoactivas que muestran potente actividad como inhibidores de MAO y ejercen actividad sobre el sistema CNS debido a la interacción con muchos receptores (Airaksinen y Kari, 1981, *Medical Biology*, 59, 190-211. Herraiz y Chaparro, 2005 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326, 378-386). Estos compuestos podrían ser muy útiles como posibles agentes antidepresivos o para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Los alcaloides quinazolínicos son potentes broncodilatadores, agentes hipotensivos y pueden tener actividad anti-protozoaria (antileishmania) (Khaliq, 2009, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19, 2585). Son estimulantes de la contracción del útero y se han utilizado como agentes abortivos. Se ha sugerido, también, que estos componentes podrían inhibir la enzima MAO, tienen actividad acetilcolinesterasa y son de uso potencial en el tratamiento de la dependencia de nicotina (WO2008007163) y en la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, estos alcaloides también podrían contribuir a los efectos psicofarmacológicos que produce la ingestión de *P. harmala*. Los alcaloides quinazolínicos también se encuentran en la planta medicinal *Adhatoda vasica* (US2003/0180392) (familia *Acanthaceae*), comúnmente conocida como Arusa, Vasaka, o Malabarnut. Esta planta se utiliza en la medicina India para el tratamiento de problemas respiratorios como catarro, asma, y resfriados, siendo los principales principios activos responsables de estas actividades, los alcaloides vasicina (peganina) y derivados de vasicina. Estos mismos compuestos pueden ser obtenidos desde la planta *P. harmala* tal y como se demuestra en esta invención.

Así pues, los principios activos de la planta *P. harmala* muestran destacada actividad biológica y farmacológica, y son utilizados en diversos tratamientos en la medicina tradicional y como remedios derivados de plantas medicinales. Sin embargo, cuando se utilizan conjuntamente podrían dar lugar a posibles efectos secundarios debido a los efectos cruzados de interacción entre principios activos en la acción farmacológica de los distintos principios activos. Así, por ejemplo, las β -carbolinas pueden mostrar actividad como inhibidores de MAO, y efectos sobre el SNC, mientras que la vasicina y los derivados quinazolínicos muestran actividad antiparasitaria o broncodilatadora. Unos u otros muestran acción citotóxica de posible aplicación en el tratamiento de tumores. Por ello, un procedimiento que consiga identificar, aislar y obtener los compuestos puros y fracciones de ellos enriquecidos con actividades selectivas para cada tratamiento tiene ventajas para su uso.

A pesar de las interesantes propiedades farmacológicas y toxicológicas de *P. harmala*, utilizada en la medicina oriental, no se han descrito con suficiente detalle procedimientos prácticos y determinaciones precisas sobre la distribución relativa y el contenido de alcaloides y principios activos en la planta. Algunos estudios son limitados y se centran en la presencia de beta-carbolinas con poca atención a las quinazolinas (Kartal *et al.*, 2003, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 263-269; Hemmateenejad *et al.*, 2006, *Analytica Chimica Acta*, 575, 290-299. Pulpati *et al.*, 2008 *Journal of AOAC International*, 91, 1179-1185). En la presente invención se describe la identificación y separación de los principales principios activos de la planta *P. harmala* tanto los alcaloides quinazolínicos como beta-carbolínicos, caracterizado su presencia en diferentes partes de la planta, y describiendo un nuevo compuesto activo caracterizado como un glicósido de peganina.

Para distinguir actividades biológicas, se determinan los alcaloides y fracciones de alcaloides de *P. harmala* útiles como inhibidores de MAO y antidepresivos y los principios activos que no poseen esta actividad. Los alcaloides producidos o extractos de ellos producidos desde la planta *P. harmala* pueden ser utilizados como productos o subproductos para la preparación de remedios farmacológicos, nutracéuticos o productos de herbolario o cosméticos basados en esta planta medicinal.

El procedimiento de invención comprende la extracción de diferentes partes de la planta *P. harmala*: hojas, flores y cápsulas verdes inmaduras y semillas secas. Se utilizan hojas, flores y capsulas verdes para la obtención de peganina (también llamada vasicina), capsulas verdes inmaduras para la obtención de peganina y deoxipeganina (también llamada deoxivasina) y semillas secas para la obtención de vasicina, un nuevo glicósido de peganina (glicósido de vasicina) y los alcaloides beta-carbolínicos harmalina y hamina. El procedimiento comprende los siguientes pasos: extracción de las partes de la planta con un extracto alcohólico en medio ácido a temperatura ambiente, ajuste del pH del extracto entre 5-11 según el compuesto a obtener, y extracción con un disolvente orgánico, y procesamiento posterior de la fase orgánica y/o la fase acuosa por concentración a vacío para obtener extractos enriquecidos de alcaloides, o bien separación por columna de cromatografía preparativa, para obtener los principios activos puros peganina, deoxipeganina, un nuevo compuesto caracterizado como glicósido de peganina, harmalina y harmina, en función de las partes de la planta que se ha extraído.

La presente invención presenta ventajas con respecto al estado de la técnica:

- 1) Se caracterizan los principales principios activos de la planta medicinal *P. harmala*, incluido un nuevo alcaloide caracterizado como glicósido de peganina.
- 2) Establece las partes de la planta a procesar según el principio activo o alcaloide a obtener.
- 3) Permite obtener los principales principios activos de la planta medicinal *P. harmala* puros o en su defecto productos o extractos enriquecidos.
- 4) Permite fraccionar dos tipos de alcaloides, quinazolina y beta-carbolina como principales principios activos naturales de la planta *P. harmala*.
- 5) Se facilita la utilización selectiva de fracciones de la planta medicinal *P. harmala* en función de los alcaloides y principios activos buscados.
- 6) El fraccionamiento selectivo por alcaloides puede posibilitar una acción farmacológica más selectiva de los productos obtenidos de esta planta medicinal reduciendo los posibles procesos toxicológicos o de interacción entre principios farmacológicos.

Descripción de la invención

- Breve descripción de la invención

Esta invención describe un procedimiento mejorado para obtener los principios activos de la planta medicinal *P. harmala*: alcaloides quinazolínicos, peganina (vasicina), deoxivasicina y un nuevo compuesto caracterizado como un glicósido de peganina o vasicina y los alcaloides beta-carbolínicos obtenidos a partir de extractos específicos de la planta *P. harmala*, así como su utilización para distintas formulaciones basadas en esta planta medicinal para el tratamiento de enfermedades respiratorias, neurodegenerativas, cancerígenas, antimicrobianas o antiparasitarias, o dermatológicas.

Se describe un procedimiento ventajoso para obtener y aislar los principios activos de la planta medicinal *P. harmala*: alcaloides quinazolínicos peganina, deoxipeganina y un nuevo compuesto caracterizado como glicósido de peganina y los alcaloides beta-carbolínicos, y que pueden ser de utilidad en preparados farmacéuticos o en formulaciones basadas en plantas medicinales, para su uso en el tratamiento de diversas patologías en las que estos principios activos son de utilidad como enfermedades respiratorias, neurodegenerativas, cancerígenas, antimicrobianas, antiparasitarias, antiprotozoarias. El procedimiento se basa en una extracción hidroalcohólica-ácida, y posterior extracción selectiva con disolventes orgánicos para la obtención de fracciones enriquecidas de los distintos alcaloides, que pueden ser separados y purificados con columna preparativa, para obtener los principales principios activos: peganina, deoxipeganina, glicósido de peganina y las beta-carbolinas, harmalina y harmina.

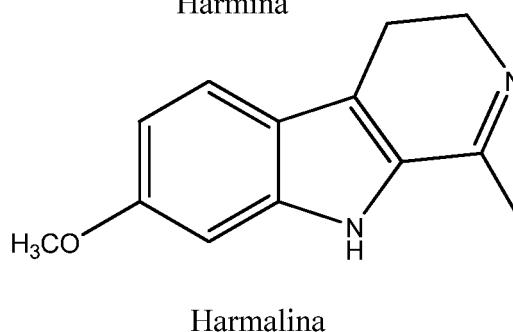
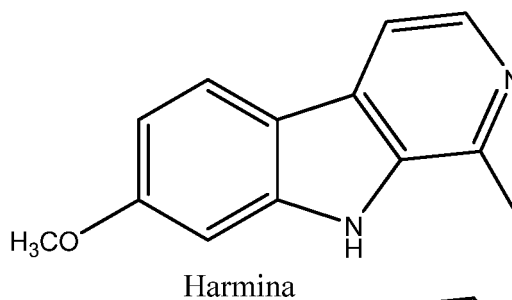
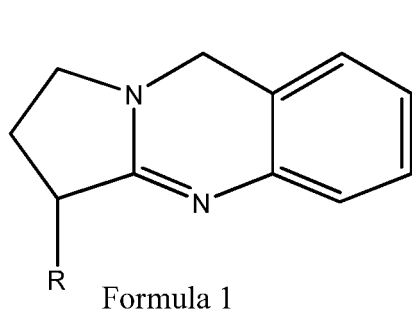
Descripción del contenido de las figuras

Figura 1. Cromatograma obtenido por RP-HPLC de los compuestos extraídos en la fase orgánica de diclorometano resultante de extraer un medio hidroalcohólico-ácido de semillas secas de *P. harmala* a pH 5 en embudo de decantación. La fase orgánica tras su concentración a sequedad y redisolución en HCl 0.1 M se inyecta en HPLC. Columna Novapak C18 (Waters). Eluyente A: tampón fosfato amónico pH 3; Eluyente B: 20% de A en acetonitrilo. Gradiente 32% B a los 8 min, 90% B a los 18 min. Aparecen principalmente los alcaloides beta-carbolínicos.

Figura 2. Cromatograma obtenido por RP-HPLC de la fase acuosa restante tras extraer un medio hidroalcohólico-ácido de semillas secas de *P. harmala* a pH 5 con diclorometano en embudo de decantación. Columna Zorbax C18 (Agilent). Eluyente A: tampón fosfato amónico pH 3; Eluyente B: 20% de A en acetonitrilo. Gradiente 32% B a los 8 min, 90% B a los 18 min. En esta fase aparecen principalmente los alcaloides quinazolínicos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un procedimiento para la producción, y obtención de los principios activos: alcaloides quinazolínicos de la formula 1, y beta-carbolinas obtenidos a partir de la planta medicinal *P. harmala* y que pueden ser utilizados como compuestos puros, mezclas o fracciones enriquecidas con utilidad farmacológica para el tratamiento de diversas patologías o condiciones patológicas y que comprende los siguientes pasos:



Donde R en la formula 1 es H (deoxivasicina) (1) ; OH (peganina o vasicina) (2); glicósido de peganina (-O-piranos-O-piranos) (3)

- extracción de las hojas y flores secas pulverizadas con una disolución alcohólica-ácida a temperatura ambiente,
- extracción de las capsulas verdes inmaduras con una disolución alcohólica-ácida a temperatura ambiente,
- extracción de las semillas secas con una disolución alcohólica-ácida a temperatura ambiente,
- extracción del extracto hidroalcohólico del paso a) con disolventes orgánicos a un pH básico,
- extracción del extracto hidroalcohólico del paso b) con disolventes orgánicos a un pH básico,

ES 2 360 547 A1

f) extracción del extracto hidroalcohólico del paso c) con disolventes orgánicos a un pH determinado, entre pH 4-11, preferiblemente pH 5,

g) utilización de la fase orgánica obtenida en el paso d) para la obtención de un extracto enriquecido en peganina (vasicina) (2), y que puede concentrarse a vacío, o pasarse por columna cromatográfica C18 para aislar peganina pura.

h) utilización de la fase orgánica obtenida en paso e) para la obtención de un extracto enriquecido en peganina (vasicina) (2) y deoxivasicina (1), que puede concentrarse a vacío o pasarse por columna cromatográfica preparativa para aislar los compuestos puros peganina (2) y deoxivasicina (1) con alta pureza,

i) utilización de la fase acuosa obtenida en paso f) para la obtención de un extracto enriquecido en peganina (2) y glicosido de peganina (3) que pueden concentrarse en vacío o que pueden separarse y aislarse por columna cromatográfica C18, para obtener los compuestos puros (2) y (3),

j) utilización de la fase orgánica del paso f) para la obtención de los alcaloides beta-carbolínicos harmina y harmalina, que pueden concentrarse o enriquecerse a vacío o que pueden separarse por cromatografía en columna C18,

k) la utilización de los extractos o productos puros obtenidos en los pasos a) hasta j), que incluyen alcaloides quinazolínicos y beta-carbolínicos para la formulación de preparados farmacéuticos, o cosméticos, útiles en el tratamiento de distintas patologías, incluido enfermedades respiratorias, cáncer, antimicrobianas, antiparasitarias, enfermedades dermatológicas.

En los pasos a), b) y c) en que el alcohol utilizado se selecciona de un grupo consistente en metanol, etanol, propanol, isopropanol, y preferiblemente etanol, metanol.

En los pasos a), b) y c) en los que el medio ácido se selecciona entre los ácido clorhídrico, perclórico, y acético, preferiblemente ácido clorhídrico o ácido perclórico.

En el paso d), e) y f), el disolvente orgánico se selecciona de un grupo consistente en diclorometano, acetato de etilo, hexano y cloroformo, y preferiblemente diclorometano y acetato de etilo.

La extracción en el paso f) se realiza entre pH 4 y 10, preferiblemente pH 5, ajustado con disolución de NaOH o KOH.

La purificación por cromatografía preparativa C18 se realiza con agua-metanol como eluyente, y permite obtener peganina (vasicina) (2) con una pureza superior al 90% desde el paso c), d), e), deoxivasicina (1) con una pureza superior al 90% desde el paso b), glicósido de peganina (3) con una pureza superior al 90% desde paso c) y las beta-carbolinas harmina y harmalina con una pureza superior al 90%.

La invención comprende la obtención de los distintos principios activos de la planta medicinal *P. harmala* desde partes seleccionadas mediante un procedimiento de extracción hidroalcohólica, extracción con disolventes orgánicos a un pH prefijado, concentración a vacío, purificación en columna preparativa C18 y los nuevos compuestos o las fracciones de estos pueden utilizarse en distintas preparaciones o formulaciones con interés farmacológico o cosmético.

En la presente invención, los compuestos aislados peganina (vasicina) (2), deoxipeganina (1) pueden ser de utilidad en formulaciones para el tratamiento de problemas o enfermedades respiratorias, antimicrobianos, antiparasitarios, antileishmaniosis, cáncer, enfermedades o problemas dermatológicos.

En la presente invención el compuesto glicósido de peganina (3) aislado de *P. harmala*, puede ser de utilidad en formulaciones para el tratamiento de enfermedades respiratorias, contracción uterina, antimicrobiano, antiparasitario, antileishmaniosis, cáncer, enfermedades dermatológicas.

En la presente invención, los alcaloides beta-carbolínicos harmalina y harmina obtenidos mediante el procedimiento citado, pueden ser de utilidad en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, y del sistema nervioso central, y para el tratamiento de la depresión por su condición de excelentes inhibidores de monoaminoxidasa (MAO), así como en el tratamiento de enfermedades parasitarias y cáncer por su carácter citotóxico y enfermedades dermatológicas.

Ejemplo de la realización de la invención

La planta *P. harmala* se recoge en la provincia de Toledo entre Abril-Diciembre y se procesa para obtener los alcaloides quinazolínicos y carbolínicos según se detalla a continuación.

ES 2 360 547 A1

Ejemplo 1

1 g de flores y hojas pulverizadas secas de *P. harmala* se extraen en un medio metanol-ácido perclórico 1:1 (20 ml), utilizando un ultraturrax y este proceso se repite dos veces más con el residuo. El extracto metánolico-ácido se lleva con NaOH 1 N a pH 9 y se extrae con 3 volúmenes de diclorometano utilizando un embudo de decantación. La fase orgánica se concentra en rotavapor para obtener un extracto enriquecido en peganina (vasicina) (2), analizado por RP-HPLC, y caracterizado por UV-VIS y HPLC-MS (ESI, masa exacta) y RMN. El compuesto se cromatografía en columna preparativa C18 para su purificación y obtener 28 mg de peganina.

Peganina (vasicina) ($C_{11}H_{12}N_2O$) (2): masa molecular: 188.0946

1H -RMN (300 MHz): ($CDCl_3$):

ESI-HR-MS (Agilent Technologies) : 189.1019 (M+H)⁺,

ESI-HPLC-MS: Eluyentes A: 0.1% ácido fórmico; Eluyente B: acetonitrilo-0.1% ácido fórmico, m/z 189 (M+H)⁺; pureza mayor de 95%

UV-VIS: max relativo 280 nm

Ejemplo 2

1 g de cápsulas (frutos) inmaduras verdes de *P. harmala* se extraen en un medio metanol-ácido perclórico 1:1 (20 ml), utilizando un ultraturrax y este proceso se repite dos veces más con el residuo. El extracto metánolico-ácido se lleva con NaOH 1 N a pH 9 y se extrae con 3 volúmenes de diclorometano utilizando un embudo de decantación. El proceso se repite varias veces y la fase orgánica se concentra en rotavapor para obtener un extracto enriquecido en peganina, identificado por RP-HPLC, UV-VIS y HPLC-MS (ESI, masa exacta) y RMN. El compuesto se cromatografía por C18 para su purificación y obtención de peganina (49 mg) (2) como antes y deoxivasicina (16 mg) (1).

Deoxipeganina (deoxivasicina) ($C_{11}H_{12}N_2$) (1): masa molecular calculada: 172.1002

1H -RMN (500 MHz) (D_2O):

ESI-HR-MS (Agilent Technologies) : 173.1075 (M+H)⁺,

ESI-HPLC-MS: Eluyentes A: 0.1% ácido fórmico; Eluyente B: acetonitrilo-0.1% ácido fórmico, m/z 173 (M+H)⁺; pureza mayor de 95%

UV-VIS: max relativo 280 nm

Ejemplo 3

5 g de semillas secas pulverizadas de *P. harmala* se extraen en un medio metanol-ácido perclórico (1:1) (200 ml) en un ultraturrax, se centrifuga a 10000 rpm 10 min y el proceso se repite dos veces más con el residuo. El extracto hidroalcohólico se diluye con agua, se ajusta a pH 5 con una solución de 1N NaOH y se extrae seis veces con 1.5 volúmenes de diclorometano en embudo de decantación. La fase orgánica (Figura 1) contiene los alcaloides beta-carbolínicos que se concentra en rotavapor y se identifican por HPLC-MS y espectros de UV-VIS. La fase acuosa que contiene, principalmente, los alcaloides quinazolínicos (Figura 2), se concentra en rotavapor a vacío a 40-55°C y el concentrado se fracciona en columna preparativa C18 que se eluye con agua-ácido fórmico para obtener los alcaloides peganina (2) y glicósido de peganina (3) en distintas fracciones que se caracterizaron por HPLC, espectroscopia y RMN y ESI-HRMS (masa exacta). La fracción que contiene el glicósido de peganina se extrae con diclorometano en medio básico para separar impurezas restantes de peganina (2) que coeluyen en la columna cromatográfica con el glicósido (3). Tras el proceso se obtienen en total 90 mg de peganina y 360 mg de glicósido de peganina (3). Por otro lado, la fase orgánica del extracto inicial de las semillas se concentra, y se separa en columna preparativa, permitiendo obtener 215 mg de harmina y 280 mg de harmalina.

Los compuestos obtenidos se caracterizan:

- Peganina (vasicina) (2) ($C_{11}H_{12}N_2O$): masa molecular: 188.0946

1H -RMN (300 MHz): ($CDCl_3$)

ESI-HR-MS (Agilent Technologies): 189.1019 (M+H)⁺,

ESI-HPLC-MS: Eluyentes A: 0.1% ácido fórmico; Eluyente B: acetonitrilo-0.1% ácido fórmico, m/z 189 (M+H)⁺; pureza mayor de 95%

UV-VIS: max relativo 280 nm

ES 2 360 547 A1

- Peganina glicósido (o vasicina glicósido) (3):

Peganina glicósido (C₂₃H₃₂N₂O₁₁): masa molecular: 512.201

5 ¹H-RMN (500 MHz): (D₂O):

ESI-HRMS (Agilent Technologies): 513.2083 (M+H)⁺,

10 ESI-HR-MS/MS (ión 513.2078) proporciona los fragmentos a *m/z* 351.1544 (C₁₇H₂₃N₂O₆) (H+H-162) (15%), y *m/z* 189.1017 (C₁₁H₁₁N₂O) (MH-324) (75%) y *m/z* 171 (C₁₁H₁₁N₂) (10%) (fragmentador V= 90 V), correspondientes a la pérdida de dos hexosas.

ESI-HPLC-MS: Eluyentes A: 0.1% ácido fórmico; Eluyente B: acetonitrilo-0.1% ácido fórmico, *m/z* 513 (M+H)⁺; pureza mayor de 95%.

15 Hidrólisis ácida de (3) en HCl conc./90°C: se degrada y proporciona varios compuestos que se separan por HPLC-MS y que corresponden a un glicósido con una molécula de hexosa (MH⁺, *m/z* 351) y un pico correspondiente a peganina (2) (*m/z* 189). Con el tiempo de hidrólisis el glicósido MH⁺ a 351 se termina hidrolizando y proporciona finalmente un pico correspondiente a peganina (2) (*m/z* 189).

20 UV-VIS: max relativo 280 nm

- Beta-carbolinas: harmalina (ESI-HPLC-MS): Eluyentes A: 0.1% ácido fórmico;

25 Eluyente B: acetonitrilo-0.1% ácido fórmico; (M+H)⁺ *m/z* 215; UV-VIS (max relativo a 355 nm); harmina (ESI-HPLC-MS): Eluyentes A: 0.1% ácido fórmico;

30 Eluyente B: acetonitrilo-0.1% ácido fórmico. (M+H)⁺ a *m/z* 213), UV-VIS (max relativo a 245 nm y 322 nm).

Estudio de inhibición de monoaminoxidasa (MAO) en las fracciones y alcaloides puros

35 Se estudió la actividad inhibidora sobre la enzima monoaminoxidasa A humana de un extracto de semillas secas de *P. harmala* (según Herraiz y Chaparro, 2006, Life Sciences 78, 295), obteniéndose que la inhibición de MAO-A es considerable con una IC₅₀ de 25 µg/L en el medio de extracción HClO₄ 0.6 M:metanol, diluido convenientemente, para la realización de los ensayos.

40 Con el fin de determinar la actividad de inhibición de MAO de los extractos, se estudió la inhibición que proporcionan la peganina (2), deoxipeganina (1) y glicósido de peganina (3). Ninguno de los compuestos tuvo una inhibición detectable hasta 15 µM. También se estudió la inhibición de las fracciones de semillas secas de *P. harmala*, correspondientes a peganina (vasicina) y glicósido de peganina por un lado y de las beta-carbolinas por otro, tras su aislamiento por HPLC-preparativa. Los datos indicaron que la actividad de inhibición de la planta *Peganum harmala* correspondió en su totalidad a la presencia de beta-carbolinas (98%) y no a la presencia de los alcaloides quinazolínicos, peganina (2) y glicósido de peganina (3). Así pues, la actividad inhibidora de MAO y su acción sobre el SNC de esta planta se debe a los alcaloides de tipo beta-carbolina y no a los de tipo quinazolina.

50

55

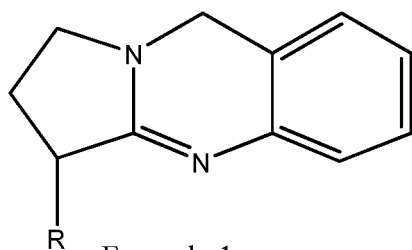
60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la obtención y producción de los principios activos de la planta medicinal *P. harmala*,
 5 **caracterizados** por ser alcaloides quinazolínicos derivados de la Formula 1, y alcaloides beta-carbolínicos como harmalina y harmina,

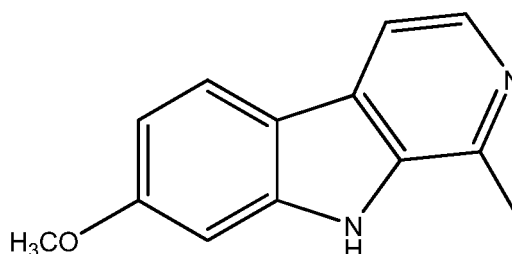
10



Formula 1

15

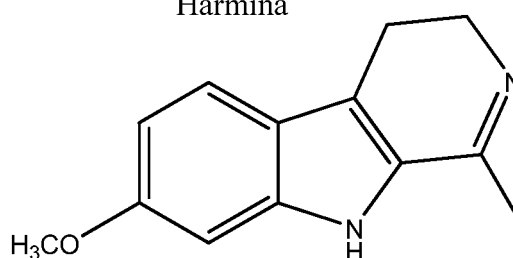
20



Harmina

25

30



Harmalina

35 donde el sustituyente R de la Formula 1, es H, deoxipeganina o deoxivasicina (1), OH, peganina o vasicina (2), o un sustituyente O-glicósido (3), donde la parte glicosídica unida al aglicón peganina (vasicina) es un disacárido constituido por dos carbohidratos o moléculas de hexosa (glucosa o sus isómeros o fructosa), y con uniones glicosídicas de la forma hexosa-O-hexosa-peganina,

40 y que se **caracteriza** por comprender alguno o varios de los siguientes pasos:

a) un procedimiento de extracción de hojas y flores pulverizadas secas de *P. harmala* en una disolución hidroalcohólica-ácida, donde el alcohol se selecciona entre metanol, etanol, propanol o isopropanol y el medio ácido entre ácido clorhídrico, ácido perclórico o ácido acético, y que se utiliza para obtener compuestos de la formula 1, preferiblemente peganina (2).

b) un procedimiento de extracción de los frutos o capsulas verdes en un medio hidroalcohólico-ácido donde el alcohol se selecciona entre metanol, etanol, propanol, o isopropanol y el medio ácido entre ácido clorhídrico, ácido perclórico o ácido acético y que se utiliza para obtener alcaloides quinazolínicos de la formula 1, preferiblemente, peganina (vasicina) (2) y deoxipeganina (deoxivasicina) (1),

c) un procedimiento de extracción de semillas secas pulverizadas en medio hidroalcohólico-ácido donde el alcohol se selecciona entre metanol, etanol, propanol, isopropanol y el medio ácido entre ácido clorhídrico, ácido perclórico o ácido acético, y que se utiliza para obtener preferiblemente los alcaloides quinazolínicos de la formula 1, peganina (vasicina) (2) y el peganina glicósido (3), y los alcaloides beta-carbolínicos harmalina y harmina,

d) un procedimiento en el que el extracto hidroalcohólico obtenido según los pasos a) o b), donde el extracto se lleva a pH básico (8-11), y se extrae con disolventes orgánicos, preferiblemente diclorometano o acetato de etilo,

e) un procedimiento en el que el disolvente orgánico obtenido en d) se concentra para obtener un extracto enriquecido en alcaloides quinazolínicos de la formula 1, preferiblemente, peganina (2) y deoxipeganina (1),

f) un procedimiento en el que el extracto obtenido según e) se purifica en columna cromatográfica para obtener puros los alcaloides peganina (vasicina) (2) y deoxipeganina (1),

g) un procedimiento en el que el extracto obtenido según el paso c) donde el extracto se lleva a pH 5-11, preferiblemente a pH 5, y se extrae con diclorometano o acetato de etilo,

ES 2 360 547 A1

h) un procedimiento según el paso g) en el que la fase acuosa que queda después de extraer con medio orgánico, se concentra a vacío para obtener un extracto enriquecido en alcaloides quinazolínicos de la fórmula 1, principalmente peganina (vasicina) (2) y peganina glicósido (3),

5 i) un procedimiento según el paso g) en el que la fase orgánica se concentra a vacío para obtener un extracto enriquecido en alcaloides de tipo beta-carbolina,

10 j) un procedimiento según el paso h) en el que los alcaloides quinazolínicos se purifican por columna cromatográfica C18, para obtener puros peganina (vasicina) (2) y glicósido de peganina (3),

k) un procedimiento según el paso i) en el que los alcaloides beta-carbolínicos se separan por columna cromatográfica preparativa para obtener puros los compuestos harmalina y harmina.

15 2. La utilización de los alcaloides quinazolínicos peganina (vasicina) (2), deoxipeganina (1) y peganina glicósido (3) de la fórmula 1, obtenidos puros, en extractos y/o fracciones enriquecidas de ellos, obtenidos desde la planta *P. harmala* según el procedimiento reivindicado en 1), para la elaboración de preparados farmacéuticos, nutracéuticos, parafarmacia, productos derivados de plantas medicinales y de herbolario, cosméticos, para el tratamiento, remedio natural o alivio de distintas enfermedades o patologías, entre las que se pueden incluir respiratorias, infecciosas, parasitarias, tumorales, neurodegenerativas.

20 3. La utilización de los alcaloides beta-carbolínicos harmalina y harmina puros y de las fracciones enriquecidas de ellos, obtenidos desde la planta *P. harmala*, según el procedimiento reivindicado en 1), para la elaboración de formulaciones o preparados farmacéuticos, nutracéuticos, preparados de plantas medicinales, y de herbolario o cosméticos para el tratamiento, remedio natural o alivio de distintas patologías, y particularmente para enfermedades del sistema nervioso central y cáncer.

30

35

40

45

50

55

60

65

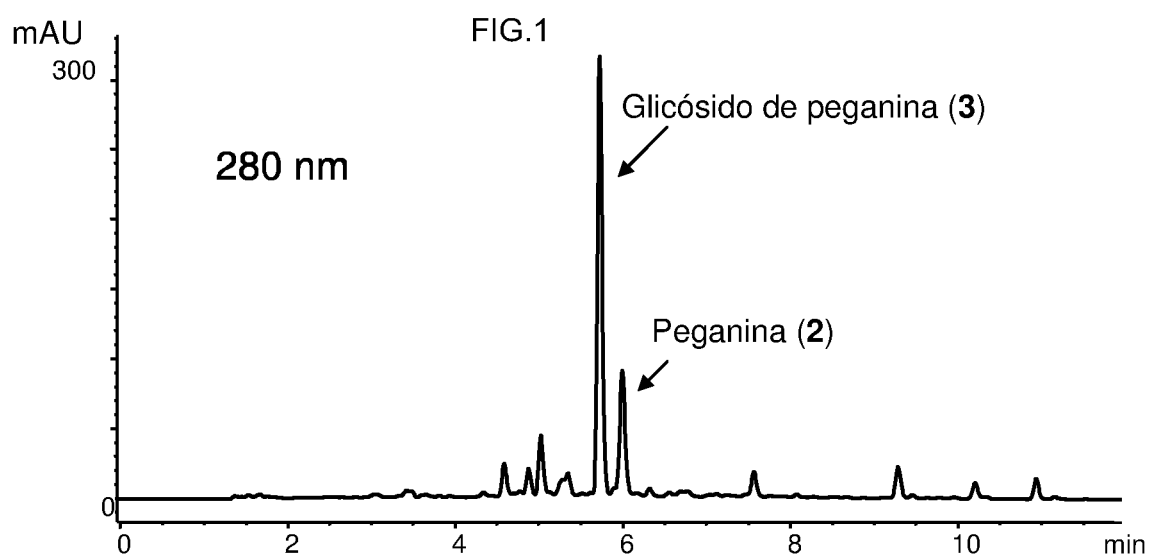
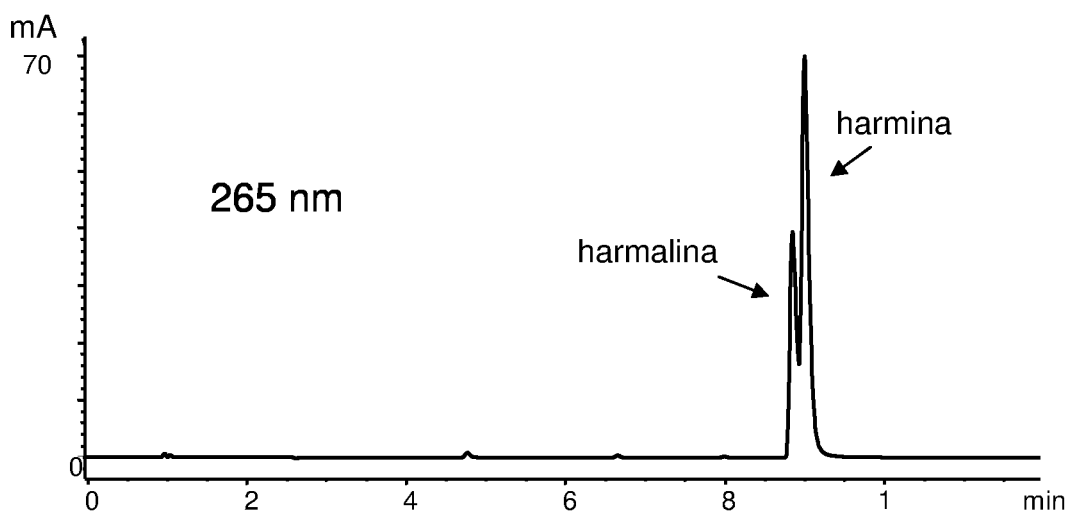


FIG. 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud:200930942

22 Fecha de presentación de la solicitud: 02.11.2009

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20080069899 A1 (JOSSANG, A. et al.) 20.03.2008, párrafos [0088]-[0089], ejemplo 1; párrafos [0112]-[0134], ejemplos 3-6; párrafos [0041]-[0042].	1-3
X	ASTULLA, A. et al. "Alkaloids from the seeds of <i>Peganum harmala</i> showing antiplasmodial and vasorelaxant activities". Journal of Natural Medicine 2008, Volumen 62, páginas 470-472. [Disponible en línea el 04.06.2008]. Ver página 470, resumen; página 470, columna 2, párrafo 3.	1-3
X	YALCIN, D. & BAYRAKTAR, O. "Inhibition of catechol-O-methyltransferase (COMT) by some plant-derived alkaloids and phenolics". Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2010, Volumen 64, páginas 162-166. [Disponible en línea el 03.05.2009]. Ver página 162, resumen e introducción; página 164, columna 1, párrafo 2; página 163, apartado 2.2.	1-3
X	HEMMATEENEJAD, B. et al. "Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline derivatives in <i>Paganum harmala</i> seed extracts". Analytica Chimica Acta 2006, Volumen 575, páginas 290-299. [Disponible en línea el 06.06.2006]. Ver página 290, resumen e introducción; página 293, apartado 2.7.	1-3
A	ES 2316595 T3 (HF ARZNEINMITTELFORSCHUNG GMBH) 16.04.2009, página 3, líneas 11-24; reivindicación 1.	1-3
A	SU 878295 B ((AUZN-R) AS UZB VEGET CHEM) 07.11.1981 (resumen) [en línea] (recuperado el 26.11.2010). Recuperado de la base de datos WPI/Thomson. Número de Acceso: 1982-74317E [35].	1-3
E	HERRAIZ, T. et al. "β-Carboline alkaloids in <i>Peganum harmala</i> and inhibition of human monoamine oxidase (MAO)". Food and Chemical Toxicology 2010, Volumen 48, páginas 839-845. [Disponible en línea el 28.12.2009]. Ver página 839, resumen; página 840, apartado 2.1.	1-3

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
23.12.2010

Examinador
G. Esteban García

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D487/04 (01.01.2006)
A61K31/519 (01.01.2006)
A61K31/4375 (01.01.2006)
A61P11/00 (01.01.2006)
A61P3/00 (01.01.2006)
A61P33/00 (01.01.2006)
A61P35/00 (01.01.2006)
A61P25/28 (01.01.2006)

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

C07D, 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, TXTE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NPL, EMBASE, PUBMED, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-3	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-3	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	US 2008/0069899 A1	20.03.2008
D02	ASTULLA, A. et al. Journal of Natural Medicine 2008, Vol. 62, pp. 470-472	04.06.2008
D03	YALCIN, D. & BAYRAKTAR, O. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2010, Vol. 64, pp. 162-166	03.05.2009
D04	HEMMATEENEJAD, B. et al. Analytica Chimica Acta 2006, Vol. 575, pp. 290-299	06.06.2006

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

El objeto de la invención es un procedimiento para la obtención y producción de los principios activos de la planta medicinal *P. harmala*, que son alcaloides quinazolínicos y β -carbolínicos, a partir de hojas, flores, frutos o semillas de dicha planta, que comprende una o varias etapas de extracción y purificación; y la utilización de los alcaloides peganina, deoxipeganina, peganina glicósido, harmina y harmalina para la preparación de diversas formulaciones farmacéuticas, nutracéuticas o cosméticas.

Novedad (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes):

El documento D01 divulga un procedimiento en varias etapas para la extracción de los alcaloides de *Peganum harmala*, que comprende la extracción de semillas molidas con metanol, la disolución del residuo obtenido tras la evaporación del disolvente en ácido clorhídrico al 2%, el lavado de la solución acuosa con diclorometano, la alcalinización de la misma con NaHCO_3 y la extracción con diclorometano. El extracto obtenido una vez eliminado el disolvente se somete a una cromatografía en columna, dando lugar, entre otras fracciones, a los alcaloides puros **harmina** y **peganina** (compuesto **2** de la invención) (ver párrafos [0088]-[0089], ejemplo 1). El documento divulga además la actividad antineoplásica del alcaloide harmina (ver párrafos [0112]-[0134], ejemplos 3-6) y su utilización para la preparación de una composición farmacéutica (ver párrafos [0041]-[0042]).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-3** no es nuevo según lo divulgado en el documento D01.

El documento D02 divulga un procedimiento para el aislamiento y purificación de los alcaloides presentes en *Peganum harmala*, como son los derivados de β -carbolina **harmina** y **harmalina**, y los alcaloides quinazolínicos **vasicinona** y **deoxivasicinona**, que mostraron diferentes actividades biológicas, en concreto, actividad antiplasmodio (en el caso de harmina y harmalina) y vasorrelajante (vasicinona) (ver página 470, resumen). El procedimiento de obtención de estos alcaloides se inicia con la extracción de semillas secas de *Peganum harmala* con metanol, que da lugar a un extracto que se disuelve en una mezcla de acetato de etilo y ácido tartárico al 3%. La fase acuosa separada se lleva a pH 10 mediante la adición de NaHCO_3 , y se extrae con cloroformo, obteniéndose una fracción que comprende los materiales solubles en cloroformo y que se somete a dos procesos consecutivos de cromatografía, primero en columna y posteriormente preparativa, tras los cuales se aíslan fracciones que contienen cada uno de los componentes (harmina, harmalina, vasicinona y deoxivasicinona) (ver página 470, columna 2, párrafo 3).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-3** no presenta novedad según lo divulgado en el documento D02.

El documento D03 divulga un procedimiento para la extracción de los productos naturales presentes en plantas de la especie *Peganum harmala*, entre los que se encuentran los alcaloides β -carbolínicos (harmina, harmalina, harmalol, harmano, etc.) y quinazolínicos (vasicina o peganina, vasicinona, etc.), algunos de los cuales, **harmina** y **harmalina**, actúan como inhibidores de catecol-*O*-metiltransferasa (COMT), y por tanto, pueden tener aplicación en la terapia de la enfermedad de Parkinson (ver página 162, resumen e introducción; página 164, columna 1, párrafo 2). El procedimiento de obtención de estos alcaloides comprende la extracción de semillas trituradas de *P. harmala* con metanol, la evaporación del disolvente, la disolución del residuo en una solución de HCl al 5%, la extracción de dicha disolución con éter de petróleo, la basificación de la fase acuosa ácida con NH_4OH hasta pH 9, la extracción con cloroformo y la evaporación del disolvente a vacío (ver página 163, apartado 2.2).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-3** no es nuevo según lo divulgado en el documento D03.

El documento D04 divulga un procedimiento para la extracción de los alcaloides β -carbolínicos (harmina, harmano, harmalol y **harmalina**) presentes en las semillas de la planta *Peganum harmala*, que presentan diversas actividades biológicas, entre los que se encuentran los efectos potenciales sobre el sistema nervioso central y el sistema cardiovascular, actividades citotóxicas y de inhibición de topoisomerasa I de DNA humano (ver página 290, resumen e introducción). El procedimiento de obtención de estos alcaloides comprende las siguientes etapas: extracción de semillas secas y pulverizadas de *P. harmala* con metanol a 50°C; evaporación del disolvente a sequedad; disolución del residuo en HCl al 2%; extracción de dicha disolución, una vez filtrada, con éter de petróleo; basificación de la fase acuosa ácida con NH_4OH hasta pH 10; extracción con cloroformo; y evaporación del disolvente (ver página 293, apartado 2.7).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-3** no presenta novedad respecto a lo divulgado en el documento D04.