

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 098**

21 Número de solicitud: 202030454

51 Int. Cl.:

**A61K 36/185** (2006.01)

**A61K 31/05** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**18.05.2020**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**19.11.2021**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**14.02.2022**

Fecha de concesión:

**06.10.2022**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**14.10.2022**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (25.0%)  
Hospital Real, Avda. del Hospicio s/n  
18071 Granada (Granada) ES y  
CELLBITEC, S.L. (75.0%)**

72 Inventor/es:

**BERMUDEZ PÉREZ, Francisco;  
PRADOS SALAZAR, Jose Carlos;  
MELGUIZO ALONSO, Consolación;  
PORRES FOULQUIE, Jesús M<sup>a</sup>;  
MESAS HERNÁNDEZ, Cristina;  
MARTÍNEZ MARTÍNEZ, Rosario;  
GALISTEO MOYA, Milagros;  
ORTIZ QUESADA, Raul;  
CABEZA MONTILLA, Laura y  
LÓPEZ-JURADO ROMERO DE LA CRUZ, María**

74 Agente/Representante:

**CAMPOS GARCIA, Vanessa**

54 Título: **Extracto etanólico de semillas de *Euphorbia lathyris*, método para obtenerlo, composición farmacéutica que lo contiene y su uso como agente antitumoral**

57 Resumen:

Extracto etanólico de semillas de *Euphorbia lathyris*, método para obtenerlo, composición farmacéutica que lo contiene y su uso como agente antitumoral.

La presente invención proporciona un método para la obtención de un extracto etanólico de semillas maduras de *Euphorbia lathyris*, preferiblemente desengrasadas, caracterizado por el uso de una solución de extracción con etanol al 50%, a pH ácido, preferiblemente bajo atmósfera de nitrógeno y durante tiempos cortos, no superiores a 1 — 2 h. Los extractos obtenidos son ricos en compuestos fenólicos, entre ellos compuestos fenólicos con actividad anticancerígena. Dichos extractos muestran una potente actividad antitumoral frente a líneas celulares de adenocarcinoma de colon y de páncreas y glioblastoma, que no se había detectado antes para extractos de semilla de *Euphorbia lathyris*, con baja toxicidad para células sanas. Por ello, se propone estos extractos, especialmente los obtenidos de semillas desengrasadas, para uso en el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 879 098 B2

## DESCRIPCIÓN

Extracto etanólico de semillas de *Euphorbia lathyris*, método para obtenerlo, composición farmacéutica que lo contiene y su uso como agente antitumoral

5

### **Sector de la técnica**

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología, botánica, nutrición y biomedicina. En concreto, se refiere a la obtención de un extracto etanólico de origen  
10 vegetal para ser usado como agente antitumoral, procedente de harina desengrasada de semilla madura de *Euphorbia lathyris* (*Euphorbia semen*).

### **Antecedentes de la invención**

15 Se entiende por cáncer a un conjunto de enfermedades caracterizadas por diversas alteraciones a nivel celular que conllevan a un exceso de proliferación y supervivencia de las células malignas, provocando anormalidades en el funcionamiento del organismo. Entre los diferentes tipos de tumores podemos destacar el cáncer colorrectal (CCR), objeto especial de estudio en la presente solicitud, por su incidencia y por la falta de un  
20 adecuado tratamiento especialmente en los estadios más avanzados de la enfermedad.

La incidencia del CCR a nivel mundial es tan relevante que se considera un auténtico problema de salud. Así, siendo el tercer cáncer más común y la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo, representa entre uno y dos millones de nuevos casos cada  
25 año. Su incidencia ha aumentado en más de 200.000 nuevos casos al año entre 1990 y 2012, detectándose con más frecuencia en los países occidentales. En España, los casos diagnosticados de cáncer en general en 2017 han sido 228.482 siendo la progresión de esta enfermedad es imparable como demuestra la previsión realizada para el año 2035 que sitúa el número de nuevos caos en 315.413. Entre ellos, el CCR  
30 es el que presenta mayor incidencia (15% del total – 34 331 casos detectados en el 2017), seguido por el de próstata, pulmón, mama, vejiga y estómago. En función del sexo, este tipo de tumor es el segundo más frecuentemente diagnosticado en hombres después del cáncer de próstata y en mujeres también se sitúa en segunda posición después del cáncer de mama. En relación a su mortalidad, el cáncer colorrectal se  
35 encuentra en segunda posición tanto en hombres como en mujeres con 15.923

defunciones al año, seguido del de páncreas.

En relación a los factores de riesgo, el principal factor que influye en este tipo de patología tumoral es la edad, siendo diagnosticados en personas mayores de 50 años (90% de los casos) sin otras patologías, clínicas ni enfermedades predisponentes. No obstante, las personas con antecedentes familiares de CCR, con pólipos intestinales o con enfermedad inflamatoria intestinal deben ser consideradas de alto riesgo. Es necesario subrayar que el consumo excesivo de alcohol, el sobrepeso y obesidad, el tabaquismo, la inactividad física y ciertos tipos de alimentos como carne procesada han sido vinculados a esta patología.

10

La terapia del CCR, a pesar de los más recientes avances, no ha conseguido resultados significativos especialmente en la fase más avanzada de la enfermedad en la que se produce una expansión metastásica del tumor que influye de forma decisiva en la supervivencia de los pacientes. Dicha expansión acontece preferentemente hacia el hígado siendo su único tratamiento posible el tratamiento con 5-fluorouracilo (5FU) asociado o no a cirugía y a otros agentes como irinotecan, capecitabine u oxaliplatino o más recientemente, a anticuerpos monoclonales del tipo cetuximab y bevacizumab (Labianca, 2010) o regorafenib y TAS-102 (Loree y col., 2017). A pesar de ello, y como claramente indica la supervivencia media de estos pacientes (15 a 20,5 meses), los resultados son muy limitados (Berrino y col., 2007). La mejora de su pronóstico, precisa pues, del desarrollo de nuevas estrategias que sumen a la actividad terapéutica a la acción preventiva (Franceschi y col., 2012).

15

20

25

30

35

El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas abarca una gran cantidad de campos de investigación que se extienden desde la nanotecnología, al uso de sistemas que activan el sistema inmune o al uso de extractos de diferentes orígenes, entre otros, que pueden ayudar a mejorar la respuesta al tratamiento. En este contexto, actualmente la actividad de extractos o derivados vegetales sobre la viabilidad y supervivencia de células tumorales está cobrando un gran interés (Goyal y col., 2017), aunque ya desde 1960 el National Cancer Institute (USA) comenzó a evaluar la actividad antitumoral y preventiva de diferentes extractos vegetales frente a diferentes carcinomas (Huang y col., 2013). Los vegetales en general y sus extractos en particular poseen grandes aplicaciones en medicina como son: i) ser una fuente directa de agentes terapéuticos, ii) materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, iii) aportar una estructura química de sus principios activos que puede servir de modelo

para la elaboración de drogas sintéticas iv) utilizar dichos principios como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos. Estas posibles aplicaciones se deben a los fitoquímicos que presentan las plantas y sus extractos. Se han identificado más de 5000 fitoquímicos en semillas, frutas, raíces, tubérculos, hojas, etc, los cuales se clasifican como compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas, alcaloides, compuestos nitrogenados y compuestos organosulfurados (Thapliyal y col., 2018).

Los compuestos fenólicos han atraído el interés de la comunidad científica debido a su gran diversidad estructural, así como de su amplia bioactividad. Los compuestos fenólicos presentan funciones esenciales en la reproducción y crecimiento de las plantas, actúan como mecanismos de defensa contra patógenos, parásitos y depredadores, además de ser el responsable de proveer el color de las plantas. No solo son beneficiosos para las plantas, sino que también juegan un papel importante en la salud humana, como antioxidantes, anticancerígenos, antibacterianos y antiinflamatorio (Huang y col., 2013).

Debido a la bioactividad que presentan, existen numerosos medicamentos y patentes cuyos principales componentes son compuestos fenólicos. Es el caso de Neumentix, un suplemento patentado, obtenido por Kemin<sup>TM</sup> (representada en España por Univar), en la que realiza un proceso de secado de la menta verde recolectada (gamas KI110 y KI42) previo a la extracción de compuestos fenólicos, entre los que destacan los ácidos rosmarínico, salvianólico y caftarico. Este suplemento rico en compuestos fenólicos demuestra, mediante estudios clínicos, beneficios en el rendimiento cognitivos. También muestra que los compuestos fenólicos que caracterizan este suplemento, actúan como agentes antioxidantes reduciendo el estrés oxidativo, promoviendo el crecimiento neuronal y protegiendo las células nerviosas del cerebro. Del mismo modo, compuestos fenólicos encontrados en la uva, arándanos y otras frutas y verduras se han estudiado para determinar su capacidad de disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas. Además, se han utilizado como suplemento para minimizar los efectos de la edad, especialmente la pérdida de memoria como es el caso de la Curcumina Optimizada con Neurophenol<sup>TM</sup> (mezcla patentada de extractos de arándanos y uva), de Douglas Laboratories® (Valencia, España: <https://www.douglaslabs.es/>) También existen comercializados extractos fenólicos patentados a partir de la pepita de la uva (Vitaflavan®, producto de DRT- Les Derivés Résiniques et Terpéniques, Dax, Francia: <https://www.vitaflavan.com/es/>), del orujo de la

uva tinta (Emitol®) y del vino tinto (Provinols®, de Sucren/Vitimed, distribuido por Seppic, La Garenne Colombes, Francia: <https://www.seppic.com/provinolstm-0>) que presentan propiedades antioxidantes.

5 En los últimos 20 años, más del 25% de los medicamentos proceden de plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales modificados (Amin y col., 2009). Cabe mencionar que tan sólo entre el 5% al 15% de las plantas de uso medicinal, han sido investigadas para la obtención de sus compuestos bioactivos. Esto destaca la importancia de la búsqueda de nuevos medicamentos a partir de especies vegetales  
10 (Rivas-Morales y col., 2016; Wong y col., 2018).

El género *Euphorbia* (Euphorbiaceae), el más grande de plantas con flores, ha sido de gran interés desde la antigüedad como demuestran las descripciones de la *E. helioscopia* L. (Levey, 1966) y euphorbio (goma de *E. resinífera* Berg.) por Hipócrates,  
15 Galeno y Dioscórides (Hargreaves, 1978; Stannard, 1964) y la descripción de Carl Linnaeus sobre el género *Euphorbia* (Nambudiri y Nambudiri, 2013).

Hoy conocemos que la *Euphorbia esula* L. posee un diterpeno con actividad biológica proinflamatoria y antitumoral (Evans y Taylor, 1983; Kupchan y col., 1976) y que el  
20 mebutato de ingenol (Picato®, distribuido por Laboratorios Leo Pharma, Barcelona, España), diterpeno aislado de *Euphorbia peplus* L, es usado para el tratamiento tópico de la queratosis actínica y cáncer de piel (Berman, 2012). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados se han centrado en la presencia de productos naturales biológicamente activos en el látex (Shi y col., 2008; Vasas y Hohmann, 2014),  
25 compuestos que por ser una fuente rica en diterpenos y triterpenos, se han relacionado con propiedades no sólo antitumorales y antiinflamatorias sino también anticonceptivas y fibrinolíticas.

El Euphol, un alcohol triterpeno tetracíclico presente en la savia de *Euphorbia*, ha  
30 demostrado ser el compuesto predominante en el látex de todas las especies de *Euphorbia* (Cruz L y col., 2018) y posee las propiedades descritas anteriormente (antiinflamatorio, anticonceptivo, etc). De hecho, Silva y col. (2018) han demostrado recientemente como este compuesto posee actividad antitumoral en 15 modelos in vitro con células tumorales en las que la dosis inhibitoria 50 (IC50) se situó entre 2-30 µM.

35

Si bien es cierto, que los estudios más numerosos se han realizado con el látex, algunos estudios han analizado otras zonas de la planta. Así, las semillas de *Euphorbia lathyris*, una de las especies más conocidas de este género, se han usado tradicionalmente en medicina para tratar la hidropesía, la ascitis, el estreñimiento, la amenorrea y la sarna a partir de extractos etanólicos de semilla seca (Liao S y col., 2005). Las semillas de *Euphorbia* contienen una gran cantidad de diterpenoides naturales, entre los que destacan los llamados Euphorbia factors L1-L28.

Bicchi y col., por ejemplo, (Bicchi y col., 2001) han descrito la presencia de fracciones diterpenoides correspondientes a ingenol y Euphorbia factors en el aceite de semillas de *Euphorbia lathyris*.

En la misma línea, el documento de Jiao W; y col. (2010) analiza un extracto etanólico de las semillas de *Euphorbia lathyris* identificando 22 tipos de compuestos, como diterpenoides, triterpenoides, esteroides, ésteres de ácidos grasos, cumarinas como esculetina. En concreto se citan los siguientes: 20-O-hexadecanoil-ingenol (4), 3-O-hexadecanoil-ingenol (5), 15,17-O-diacetil-3-O-cinamoil-17-hidroxiquinol (6), 5,15,17-O-triaceil-3-O-benzoil-17-hidroxiisolatirol (7), 5,15-O-diacetil-3-O-nicotinoil-latirol (8), 5,15-O-diacetil-3-O-benzoil-7-O-nicotinoil-7-hidroxi-latirol (9), ingenol (10), latirol (11), esculetina (12),  $\beta$ -sitosterol (13), benzeno-1,2,3-triol (14), ácido palmítico (15), icosanoato de 2,3-dihidroxipropilo (16), oleato de 2,3-dihidroxipropil (17), hexadec-3-enoato de 2,3,4-trihidroxi-butilo (18), acetato de aurantianida (19), ácido benzoico (20), ácido p-hidroxibenzoico (21), ácido oleico (22).

Los compuestos extraídos de las semillas han demostrado una gran citotoxicidad frente a células cancerosas. Así, por ejemplo, Teng y col. (Teng Yu-Ning y col., 2018), de forma similar a Meng y col. (Meng y col., 2013), describen la preparación de un extracto etanólico de semillas de *Euphorbia lathyris*, mediante un proceso en el que se utiliza etanol al 95% a reflujo, durante varias horas; también describen una partición de éter de petróleo. Los principales compuestos presentes en el extracto obtenido por dichos autores son diterpenoides de tipo latirano, destacando cinco diterpenos con estructura de latirano (los Euphorbia factors L1, L2, L3, L8 y L9) que presentan actividad citotóxica frente a líneas celulares de carcinoma de pulmón, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de mama y cáncer de mama triple negativo. Duan y col. (Duan y col., 2014), por su parte, exponen en su introducción que ya se conoce que las semillas de *Euphorbia* tienen un

efecto significativo en el tratamiento de la leucemia, carcinoma y cáncer de piel; describen en el mismo artículo la preparación de un extracto a partir de semillas de *Euphorbia lathyris* y analizan los componentes de un extracto de éter de petróleo de dichas semillas, identificando en el mismo diez compuestos derivados del latirano.

5

Fan y col. (2019), en un reciente estudio realizado sólo sobre el factor L2 aislado a partir de las semillas de *Euphorbia*, encontraron que posee actividad antiproliferativa frente a un tipo muy específico de tumor como es el carcinoma hepatocelular.

10 También se han demostrado para los extractos de *Euphorbia lathyris* efectos moduladores de la resistencia a múltiples fármacos (MDR) y la P-glicoproteína (Wang Q y col., 2018).

15 Por tanto, la semilla de *Euphorbia*, de la que se han identificado y aislado muchos componentes bioquímicos, posee una extensa actividad farmacológica, pero todavía es necesario explorar nuevos compuestos químicos, así como los mecanismos farmacológicos y toxicológicos exactos (Zhu y col., 2018).

20 Autores como Zhang y cols., 2017, además de hacer referencia a componentes fitoquímicos previamente conocidos de *Euphorbia lathyris* tales como diterpenos, euforbetina, esculetina, dafnetina, beta-sitosterol, kaempferol-3-gluclurónido, vitexcarpina, artementina, daucosgterol, p-hidroxibenzoido, flavonas o glucósidos de flavonol, ya describen diferentes componentes del tipo ácidos fenólicos y flavonoides, tales como ácido gálico, ácido clorogénico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido p-  
25 cumárico o ácido cafeico, en la raíz, tallo y semilla de la *Euphorbia lathyris*, varios de los cuales poseen capacidad antioxidante, aunque realizan un método de extracción basado en la acetona altamente tóxico para las células, además de incluir una extracción con acetato de etilo y no realizan estudios de capacidad antitumoral.

30 Otros autores, como Nam y Lee (2000), realizaron ensayos de la capacidad antitumoral de extractos de la *Euphorbia lathyris* encontrando cierta actividad antiproliferativa. Sin embargo, los extractos son realizados con metanol, altamente tóxico y, por tanto, con poca utilidad para su aplicación *in vivo*. Además, la actividad es demostrada sólo en células de cáncer de pulmón *in vitro*, no detectando actividad antitumoral para cáncer de  
35 colon.

Por otra parte, Sdayria y col, 2018 muestran, mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, los efectos antioxidantes, antinociceptivos y antiinflamatorios que presentan los compuestos fenólicos (ácido gálico, epicatequina, ácido cumárico, apigenina, naringenina, rutina, quercetina y kaempferol) presentes en los extractos obtenidos mediante procesamiento con metanol (extractos metanólicos) a partir de las hojas de *Euphorbia retusa*, considerando este extracto metanólico un agente efectivo para el tratamiento de dolor y la inflamación ya que inhibe algunos mediadores de la inflamación como son MDA y COX-2 e incrementa la actividad de SODm CAT y GPx en el hígado.

Componentes presentes en la *Euphorbia lathyris* y que podrían estar relacionados con una actividad antiproliferativa, tales como los compuestos fenólicos esculetina, euforbetina, gaulterina, nicotiflorina (Kaempferol-3-rutinósido) y carnosol han sido analizados por algunos autores (Lee y col., 2017 and 2019; Turkekul y col., 2018; Aliebrahimi y col., 2018; HefnyGad y col., 2018) de forma independiente. Los estudios de actividad antitumoral reflejados en dichos documentos se realizaron con los compuestos adquiridos de casas comerciales, no con extractos de *Euphorbia lathyris*. Así, por ejemplo, Lee y col., (2017 y 2019) ensaya la Esculetina, un derivado de la cumarina, en células derivadas de cáncer de pulmón de células no pequeñas, evidenciando un efecto antitumoral frente a dicho cáncer. De forma similar, Wang y cols., (2002) ya ensayó esta molécula frente a células de leucemia (HL-60) observando un incremento de apoptosis. Sin embargo, ninguno de estos autores usa extractos de *Euphorbia lathyris* en sus estudios que se centran en la exposición de las células tumorales a la molécula descrita adquirida de forma comercial y por tanto sin interacción con otras moléculas.

Así, puede decirse que en la bibliografía existente hasta el momento aparecen extractos realizados utilizando disolventes orgánicos altamente tóxicos y/o procesos de extracción de gran complejidad y duración tras los que se obtienen extractos con una gran variedad de componentes (flavonoides, cumarinas y terpenoides) que pueden aumentar la toxicidad de dichos extractos. Se ha probado la actividad anticancerígena de algunos de dichos extractos frente a líneas celulares de varios tipos concretos de cáncer, tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de mama y cáncer de mama triple negativo, conociéndose también que varios de los compuestos incluidos en dichos extractos tienen propiedades anticancerígenas frente a distintos tipos de cáncer. Sin embargo, no se ha probado la posible actividad de

extractos de semilla de *Euphorbia lathyris in vivo*, posiblemente por el riesgo de toxicidad de los mismos, ni se ha comprobado si alguno de dichos extractos podría tener actividad frente a cánceres tan habituales como el cáncer de colon o el de páncreas, o tan agresivos y difíciles de controlar como el glioblastoma. Sería interesante poder  
5 desarrollar un proceso de extracción de semillas de *Euphorbia lathyris* que utilizara solventes no tóxicos y que, además diera lugar a extractos con una composición más específica de sustancias activas y de baja toxicidad como son los compuestos fenólicos de dicha planta, especialmente porque dicho proceso, además de ser sencillo de realizar, tendría la ventaja de que podría plantearse el uso del extracto obtenido para el  
10 desarrollo de fármacos con actividad proliferativa frente a los tipos de cáncer mencionados.

La presente invención proporciona una solución a dicho problema.

## 15 Sumario de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto vegetal etanólico procedente de semillas maduras de *Euphorbia lathyris*, que comprende las etapas de:

- 20
- a) moler la semilla para obtener harina;
  - b) extraer la harina de la etapa a) mediante una solución hidroalcohólica de extracción en frío y a pH ácido; y
  - c) opcionalmente, desengrasar la semilla madura mediante prensado mecánico en frío antes de realizar las etapas a) y b).

25 Preferiblemente, el procedimiento de la invención se lleva a cabo en las siguientes condiciones:

- a) la semilla se muele hasta obtener harina con un tamaño de partícula de entre 100  $\mu\text{m}$  y 150  $\mu\text{m}$ ; y
- b) la harina obtenida en la etapa a) se extrae con la solución hidroalcohólica de  
30 extracción en las siguientes condiciones de operación:
  - i. temperatura igual a 4°C,
  - ii. en atmósfera de nitrógeno,
  - iii. la solución de extracción se compone de etanol, agua bidestilada y ácido clorhídrico en proporciones 50 : 50 : 0,2 en volumen,
  - 35 iv. pH igual a 2,

v. la mezcla de la harina y la solución de extracción se mantiene en agitación durante 30 minutos tras haber alcanzado las condiciones i a iv y donde el extracto etanólico se obtiene centrifugando la mezcla de la solución de extracción y la harina y recogiendo el sobrenadante.

5

Se prefiere muy especialmente que, cualesquiera que sean las condiciones específicas de las etapas de obtención de harina y extracción, se lleve a cabo el desengrasado previo a la obtención de la harina a una temperatura de entre 40 a 50°C y con una velocidad de extracción de 2 a 3 kg de semilla/hora.

10

En otra realización preferida, también combinable con cualquiera de las demás, se efectúa una nueva extracción sobre el residuo resultante de la primera extracción, concretamente sobre el precipitado resultante de obtener un extracto inicial tras centrifugación, aplicando las siguientes subetapas:

15

i) el precipitado resultante de centrifugar la mezcla de la harina y la solución de extracción se resuspende en solución de extracción,

ii) la suspensión obtenida se mantiene de nuevo en agitación durante 30 minutos en las condiciones de la etapa b) definidas en la reivindicación 2,

20

iii) la suspensión se somete a centrifugación, recogándose el sobrenadante, y

iv) el extracto etanólico resulta de mezclar el sobrenadante obtenido en iii) con el primer sobrenadante obtenido.

25

El procedimiento de la invención puede contener una etapa final adicional, también combinable con cualquiera de las posibles realizaciones, en la que se evapora parcial o totalmente el etanol del extracto etanólico obtenido.

30

En otro aspecto, la invención se refiere a un extracto etanólico de semillas maduras de *Euphorbia lathyris* rico en compuestos fenólicos. Dicho extracto será obtenible por el método de la presente invención.

35

El extracto etanólico rico en compuestos fenólicos puede presentar un contenido de compuestos fenólicos totales que oscila entre 15,64 y 39,31 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto y/o una capacidad reductora que oscila entre 9,43 y 24,87 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto. En posibles realizaciones, el contenido de

compuestos fenólicos totales puede ser de  $15,85 \pm 0,21$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto o de  $33,52 \pm 5,79$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto, y la capacidad reductora puede ser de  $9,71 \pm 0,28$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto o de  $22,95 \pm 1,92$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto.

5

En otra posible realización, compatible con las anteriores, el extracto etanólico comprende al menos un polifenol seleccionado del grupo de esculetina, euforbetina, gaulterina, nicotiflorina (kaempferol-3-rutinósido) y carnosol, preferiblemente al menos dos compuestos fenólicos seleccionados del grupo de esculetina, euforbetina y  
 10 kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina), siendo posibles combinaciones para la definición del extracto la presencia en el mismo de esculetina y euforbetina, euforbetina y kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina), esculetina y kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina) y, particularmente, la presencia de dichos tres compuestos fenólicos, esculetina, euforbetina y kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina), especialmente si aparecen como  
 15 compuestos fenólicos mayoritarios y más especialmente, si se define que el extracto comprenda también al menos uno de los otros compuestos fenólicos seleccionado del grupo de gaulterina y carnosol o más, preferiblemente, los dos. Así, es una realización especialmente preferida del extracto de la presente invención, que el mismo comprenda los compuestos fenólicos esculetina, euforbetina, gaulterina, kaempferol-3-rutinósido  
 20 (nicotiflorina) y carnosol. En cualquiera de estas definiciones, se prefiere que esté presente la esculetina y a una concentración de: i) los intervalos de  $985,9$   $\mu\text{g/L}$  a  $1197,2$   $\mu\text{g/L}$  y  $2041,5$   $\mu\text{g/L}$  a  $2325,8$   $\mu\text{g/L}$  peso de compuesto : volumen de extracto, todos los valores incluidos, y/o ii)  $0,4 \pm 0,05$  mg de compuesto por 100 mg de extracto o  $0,21 \pm 0,023$  mg de compuesto por 100 mg de extracto, y/o que esté presente el kaempferol-3-  
 25 rutinósido (nicotiflorina) y una concentración de: i) los intervalos de  $59,8$   $\mu\text{g/L}$  a  $61,1$   $\mu\text{g/L}$  y de  $188,3$   $\mu\text{g/L}$  a  $354$   $\mu\text{g/L}$ , peso de compuesto : volumen de extracto etanólico, todos los valores incluidos, y/o ii)  $0,02 \pm 0,003$  mg de compuesto por 100 mg de extracto etanólico o  $0,21 \pm 0,023$  mg de compuesto por 100 mg de extracto etanólico.

30 Como en el caso del procedimiento de la invención, y en los otros aspectos de la invención que se describen más adelante, se prefieren las realizaciones que corresponden a semillas maduras desengrasadas. Así, en el caso del extracto etanólico de la invención, se prefiere que cumpla la definición en función de los parámetros bioquímicos obtenibles para semillas maduras desengrasadas, es decir, el extracto  
 35 donde

i) el contenido de compuestos fenólicos totales es de  $3,52 \pm 5,79$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto y/o la capacidad reductora es  $22,95 \pm 1,92$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto,

5 ii) el extracto comprende los compuestos fenólicos esculetina, euforbetina, gaulterina, kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina) y carnosol,

iii) la esculetina está presente a una concentración de entre  $2041,5$   $\mu\text{g/L}$  y  $2325,8$   $\mu\text{g/L}$  (p/V - peso de compuesto : volumen de extracto), ambos valores incluidos, y/o a una concentración de  $0,21 \pm 0,023$  mg de compuesto por 100 mg de extracto, y

10 iv) el kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina) está presente a una concentración de entre  $188,3$   $\mu\text{g/L}$  a  $354$   $\mu\text{g/L}$  (p/V - peso de compuesto : volumen de extracto), ambos valores incluidos, y/o a una concentración de  $0,02 \pm 0,003$  mg de compuesto por 100 mg de extracto.

En cualquiera de las definiciones, se prefiere que el extracto se haya obtenido por el  
15 procedimiento de la presente invención, en su definición más general o en alguna de sus posibles realizaciones; se incluye dentro de ellas la posibilidad de que se lleve a cabo la etapa adicional final opcional en la que se lleva a cabo la evaporación final, parcial o total, del etanol. Se prefiere, de nuevo, que se haya llevado a cabo la etapa de desengrasar la semilla madura mediante prensado mecánico en frío antes de realizar la  
20 etapa a) de moler la semilla y la etapa b) de extraer la harina obtenida y, especialmente, que cada una de las posibles etapas (desengrasado, molienda y extracción propiamente dicha) se lleven a cabo con las características definitorias expresadas al describir las posibles realizaciones del método de la invención, incluyendo la realización de una segunda extracción sobre el precipitado resultante de la centrifugación que da lugar al  
25 extracto inicial.

Es también un aspecto de la presente invención una composición farmacéutica, que será considerada una composición farmacéutica de la presente invención, que comprende en su formulación un extracto de la presente invención, en cualquiera de las  
30 posibles realizaciones que se han descrito más arriba, como por ejemplo la de los extractos obtenidos por el método de la presente invención en los que se ha llevado a cabo la evaporación final, parcial o total, del etanol. La composición puede ser una composición farmacéutica combinada que adicionalmente comprende al menos un agente anticancerígeno adicional a los presentes en el extracto. En otra posible  
35 realización, también compatible con cualquier otra, la composición puede comprender,

además, uno o más excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Puede considerarse también que el anterior aspecto de la invención implica también que está comprendido dentro de la presente invención el uso de un extracto de la presente  
5 invención para la preparación de una composición farmacéutica, particularmente si la misma está destinada al tratamiento del cáncer, especialmente si el mismo se selecciona del grupo de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma.

También son aspectos de la invención un extracto de la presente invención, o una  
10 composición farmacéutica de la presente invención, para su uso en el tratamiento un tipo de cáncer que se selecciona del grupo de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma. Más concretamente, el cáncer puede seleccionarse del grupo de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pancreático y glioblastoma multiforme. En estos aspectos de la invención, tanto el referido al extracto como a la composición  
15 farmacéutica, se prefieren los extractos de semillas maduras desengrasadas y las composiciones farmacéuticas preparadas a partir de los mismos. Se tiene especialmente preferencia, particularmente cuando se ha partido de semillas desengrasadas para obtener el extracto y/o la formulación farmacéutica, por el tratamiento del adenocarcinoma de colon, muy especialmente si es resistente a quimioterapia.

20

Los aspectos referidos al uso terapéutico de un extracto de la invención o de una  
composición farmacéutica de la invención puede también definirse, o están relacionados con, un método de tratamiento de un sujeto que padece un cáncer que se selecciona entre cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma, que comprende la  
25 administración de una composición farmacéutica de la invención o de una cantidad terapéuticamente efectiva de un extracto de la invención. El sujeto, al igual que en la definición del extracto de la invención o la composición farmacéutica de la invención para uso terapéutico, puede ser cualquier mamífero, con preferencia por un ser humano.

### 30 **Descripción de los dibujos**

La figura 1.- Muestra un esquema de la metodología para la obtención de un extracto etanólico a partir de harina de semilla.

35 La figura 2.- Muestra una imagen representativa de la diferencia macroscópica entre

extractos etanólicos de la harina de la semilla madura de *Euphorbia lathyris* sin desengrasar (a), y de la semilla madura de *Euphorbia lathyris* previamente desengrasada (b) en base a la diferente presencia de compuestos lipídicos.

5 La figura 3.- Muestra una gráfica de las réplicas de la cromatografía de los extractos etanólicos a partir de la harina de semilla madura sin desengrasar de *Euphorbia lathyris*.

La figura 4.- Muestra una gráfica de las réplicas de la cromatografía de los extractos etanólicos a partir de la harina de semilla madura previamente desengrasada de  
10 *Euphorbia lathyris*.

La figura 5.- Muestra el revelado de membranas de Western Blot para expresión de Caspasa 3, 8 y 9 en células de la línea tumoral de colon T84 tratadas con una IC<sub>50</sub> del extracto etanólico a partir de harina de semilla madura desengrasada de *Euphorbia*  
15 *lathyris*.

La figura 6.- Muestra una representación del nivel de expresión de las Caspasas 3, 8 y 9 en células tumorales de colon T84 tratadas con una Ic50 del extracto etanólico a partir de harina de semilla madura desengrasada de *Euphorbia lathyris*.

20 La figura 7.- Muestra imágenes obtenidas a diferentes tiempos (0, 8, 24, 48 y 72 horas) de los ensayos de migración celular realizados con dosis subcitotóxica del extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasadas de *Euphorbia lathyris* sobre células tumorales de colon T84.

25 La figura 8.- Muestra, una representación del porcentaje de migración celular al tratar con una dosis subcitotóxica del extracto etanólico de harina de semillas maduras desengrasadas de *Euphorbia lathyris* células tumorales de colon T84 a diferentes tiempos.

30

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se basa en la obtención y en un análisis profundo del extracto etanólico de una especie vegetal del género *Euphorbia* (Euphorbiaceae), más  
35 concretamente, harina de la semilla madura de *Euphorbia lathyris*, también conocida

como semen *Euphorbia* preferiblemente desengrasada, concretamente hemos utilizado la variedad S3201, desarrollada y mantenida por la empresa Agroiintec Solutions, perteneciente al grupo Cellbitech, y el lote de semillas utilizado es el L1-3201.

5 En respuesta a los posibles inconvenientes presentados por los extractos de dicha semilla descritos en el estado de la técnica, obtenidos con disolventes tóxicos que dificultaban su aplicación *in vivo*, se ha desarrollado un extracto que presenta bioactividad favorable y puede obtenerse utilizando procesos de extracción sencillos, de corta duración y utilizando solventes no tóxicos, al tiempo que permite unos  
10 rendimientos de extracción adecuados. Este nuevo extracto presenta además una composición más específica de sustancias activas y de baja toxicidad como son los compuestos fenólicos de *Euphorbia lathyris*.

La presente invención se basa en:

15

1) El desarrollo de un extracto etanólico a partir de harina de semilla madura de *Euphorbia lathyris* que, una vez analizada, posee un elevado contenido en compuestos fenólicos. El extracto se ha obtenido a partir de la harina de las semillas maduras, sin desengrasar y, de la harina de semillas madura, previamente desengrasadas, tras un  
20 proceso de extracción etanólica en frío (a temperatura entre 0°C y 8°C, preferiblemente a 4°C) de corta duración (90 min.) totales de tiempo de contacto del etanol con la harina y el posible pellet resultante de un primer proceso de extracción, bajo atmósfera de Nitrógeno y en medio ácido, el cual se compone en su gran mayoría de compuestos fenólicos disueltos en un solvente de baja toxicidad.

25

2) La potente actividad antitumoral de los extractos de semilla de *Euphorbia lathyris* cuando son testados en cultivos celulares de cáncer de colon (T84 de cáncer colorrectal humana, HCT15 de cáncer colorrectal resistente a quimioterapia) utilizando como control una línea epitelial de intestino humano normal (CCD18) y testándolos sobre la línea de  
30 hepatocitos humanos HepG2 para determinar el rango terapéutico. Así mismo, se han estudiado los mecanismos de acción por los que los extractos actúan sobre las células tumorales para dilucidar las rutas moleculares que activan la muerte celular.

Los resultados obtenidos por la investigación que se divulga en la presente solicitud  
35 demuestran que:

- 1) La metodología empleada para la obtención del extracto etanólico (extracción hidroalcohólica) a partir de la harina procedente de semillas maduras, sin desengrasar y desengrasadas, de *Euphorbia lathyris*, da como resultado un producto muy rico en compuestos fenólicos.
- 2) El procesamiento metodológico de desengrasado, que se corresponde con realizaciones preferidas de la presente invención, supone una ventaja adicional de importancia para el desarrollo posterior del extracto etanólico de la presente invención, ya que autores como Bicchi y col. (2001), como se discutió más arriba, han descrito la presencia de fracciones diterpenoides correspondientes a ingenol y Euphorbia factors en el aceite de *Euphorbia lathyris*. El proceso de desengrasado va a permitir, por una parte, la concentración en la harina desengrasada de compuestos fenólicos de alta capacidad bioactiva que asegure un rendimiento de extracción elevado, y, por otra, la eliminación de compuestos diterpenoides que pueden resultar tóxicos. Aun así, como puede verse en el Ejemplo 2 más adelante en los ensayos realizados con distintas líneas celulares derivadas de cáncer de colon, tanto el extracto de la harina de semilla madura sin desengrasar como de la semilla madura desengrasada, poseen una gran actividad antiproliferativa, siendo las IC<sub>50</sub> muy bajas en ambos casos, lo que permite plantearse el uso de ambos extractos para la preparación de composiciones farmacéuticas. Esta idea se ve reforzada por el hecho de que ambos extractos muestran también capacidad antiproliferativa frente a otros tipos de cáncer, como el glioblastoma multiforme o el cáncer de páncreas, por lo que ambos extractos, o composiciones farmacéuticas preparadas a partir de los mismos, podrían usarse también para el tratamiento de esos otros dos tipos de cáncer.
- 3) El extracto etanólico de la harina (tanto sin desengrasar como desengrasada) de la semilla madura de *Euphorbia lathyris* posee una elevada actividad antitumoral, específicamente en células derivadas de cáncer de colon tanto resistentes como no resistentes a quimioterapia, induciendo un potente efecto antiproliferativo, que no se observó en las células normales de epitelio de colon ni en los hepatocitos humanos, por lo que existe un amplio rango terapéutico. Los resultados obtenidos con células derivadas de cáncer de colon son especialmente

significativos, no sólo por la alta incidencia en la población que presenta el cáncer colorrectal en general, sino también porque se trata de un tipo de cáncer respecto a cuyo control no se habían realizado experimentos con otros extractos de *Euphorbia lathyris* o, como en el caso del estudio de Nam y Lee publicados en el año 2000 antes citados, los resultados obtenidos al testar extractos frente a células derivadas de cáncer de colon no habían mostrado capacidad antitumoral.

4) El efecto antiproliferativo del extracto etanólico procedente de harina de semilla, tanto desengrasada como sin desengrasar, también posee una elevada actividad antitumoral frente a líneas celulares de glioblastoma multiforme, uno de los cánceres más agresivos y difíciles de tratar, incluso en los ensayos realizados con líneas celulares resistentes a quimioterapia. También se observan efectos antiproliferativos frente a líneas celulares de cáncer de páncreas, concretamente de adenocarcinoma pancreático.

5) Dosis no citotóxicas del extracto etanólico procedente de semillas maduras desengrasadas de *Euphorbia lathyris*, ralentizan hasta en un 20% a las 72 horas la migración de las células tumorales de cáncer de colon.

6) En la actividad antitumoral que presenta el extracto etanólico está implicada la ruta de las caspasas, produciéndose muerte celular por apoptosis.

Así, la metodología de extracción etanólica proporcionada por la presente invención permite la obtención de un extracto no tóxico para su empleo en biomedicina, particularmente como antitumoral. Dicha metodología representa una enorme ventaja para la finalidad de su aplicación en pacientes, pues se basa en la utilización de etanol, un solvente que es usado de forma habitual y a bajas concentraciones para la administración de principios activos.

El uso de etanol supone una gran ventaja para la aplicación clínica de los extractos obtenidos, especialmente si se compara con los extractos de semilla de *Euphorbia lathyris* descritos en el estado de la técnica en los que se utilizan solventes tóxicos como la acetona, compuesto altamente tóxico para las células, además de incluir una extracción con acetato de etilo (véase Zhang et al., 2017, documento en el que tampoco se estudia la capacidad antitumoral ni de la posible toxicidad de dichos extractos). De

forma similar, la obtención de extractos de *Euphorbia lathyris* basados en el uso de metanol (Nam y Lee, 2000) invalidan su uso *in vivo* a pesar de haber demostrado cierta capacidad antitumoral. El proceso de la presente invención también es ventajoso con respecto a aquellos casos en los que se han ensayado procesos de extracción  
5 utilizando una partición de éter de petróleo tras la obtención de un extracto de Etanol al 95% en reflujo, tras lo que se obtienen extractos enriquecidos en terpenos como los *Euphorbia factors* (Duan y col., 2014; Teng y col., 2018; Zhang y col., 2018), a diferencia de los extractos de la presente invención, que están enriquecidos en compuestos fenólicos.

10

La metodología utilizada en la presente invención presenta también ventajas con respecto a la utilizada en algunos documentos en los que sí se obtiene un extracto etanólico de la semilla de *Euphorbia lathyris* (Meng y col., 2013; Teng y cols., 2018). Es importante señalar que la metodología descrita en dichos documentos es radicalmente  
15 distinta del procedimiento de la presente invención, ya que utilizan etanol al 95% en vez de al 50% y un proceso de extracción por reflujo durante varias horas a un pH no ácido, en lugar del proceso corto, con un tiempo de extracción de total no superior a 1-2 horas, del procedimiento de la presente invención. Sorprendentemente, las diferencias metodológicas dan lugar a que la composición de los extractos obtenidos también lo  
20 sea, observándose que la variedad de compuestos presentes es muy diferente entre dichos extractos y los obtenidos por el procedimiento de la presente invención. De hecho, como se discutió más arriba, estos autores obtuvieron principalmente diterpenoides de la semilla de tipo latirano (*Euphorbia factors* L1, L2, L3, L8 y L9), los cuales no aparecen en el extracto de la presente invención, que principalmente presenta  
25 compuestos fenólicos, como se muestra en el Ejemplo 1 que aparece más adelante.

Debe destacarse también que ninguno de los documentos anteriores, ni otros centrados en alguno de los compuestos contenidos en ellos (como el documento de Fan y col. De 2019, centrado en el factor L2) menciona que los extractos obtenidos, o los compuestos  
30 contenidos en ellos, presenten actividad frente a cáncer colorrectal o a células derivadas del mismo, aunque sí menciona citotoxicidad o capacidad antiproliferativa contra líneas celulares derivadas de otros tipos de cánceres, como cáncer de pulmón y mama, o un tipo muy específico de tumor como es el carcinoma hepatocelular. Este hecho, unido a los resultados de falta de actividad de extractos de *Euphorbia lathyris* frente a células  
35 derivadas de cáncer de colon obtenidos por Nam y Lee en el 2000, hacen que no fuera

obvio esperar que extractos etanólicos como los de la presente invención, obtenidos semillas maduras de *Euphorbia lathyris*, pudieran presentar actividad frente a células derivadas de cáncer de colon, como de hecho la presentan, según se demuestra en el Ejemplo 2 de la presente solicitud. Tampoco era esperable que los extractos etanólicos de la presente invención, tanto los procedentes de semillas desengrasadas como no desengrasadas, mostraran actividad ni contra células derivadas de glioblastoma o cáncer de páncreas, tipos de cáncer para los cuales no se habían realizado tampoco ensayos antiproliferativos con extractos de semillas de *Euphorbia lathyris*.

Es muy destacable, además, que los efectos antiproliferativos se observan incluso en una línea celular de adenocarcinoma de colon resistente a quimioterapia. Es más, los ensayos de migración de células tumorales descritos en el Ejemplo 4 en los que se muestra que, a dosis no citotóxicas del extracto procedente de semillas desengrasadas, las células tumorales de colon migran significativamente menos que los controles, indican que el extracto de la presente invención, a dosis no citotóxicas, ralentizaría significativamente la invasividad y la formación de metástasis, un factor muy importante en el control de cualquier tipo de cáncer, y del cáncer colorrectal en particular, lo que apoya aún más la posible utilización como agente anticancerígeno, o como componente utilizado en la preparación de composiciones farmacéuticas anticancerígenas, de los extractos de la presente invención, especialmente contra el cáncer de colon y, en particular, contra el adenocarcinoma de colon resistente a quimioterapia..

En cuanto a la composición de los extractos obtenidos, tanto el extracto procedente de semillas maduras sin desengrasar como el de semillas desengrasadas son ricos en compuestos fenólicos, a diferencia de lo observado en otros extractos etanólicos del estado de la técnica. Así, los extractos etanólicos de la presente invención pueden definirse por valores bioquímicos obtenibles para los mismos según los resultados del Ejemplo 1 y, de forma genérica, pueden definirse como extractos etanólicos de semillas maduras de *Euphorbia lathyris* ricos en compuestos fenólicos, pues así son los extractos obtenibles por el método de la presente invención. Como puede verse en dicho Ejemplo 1, tomando los valores inferiores y superiores de los resultados obtenidos con ambos tipos de semillas, puede decirse que los extractos de *Euphorbia lathyris* de la presente invención presentan un contenido de compuestos fenólicos totales que oscila entre 15,64 [15,85-0,21] y 39,31 [33,52+5,79]  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto), según los valores inferiores de semillas sin desengrasar y los valores

superiores de semillas desengrasadas obtenibles de acuerdo con los resultados del Ejemplo 1. Análogamente, puede considerarse que los extractos de la presente invención presentan una capacidad reductora que oscila entre 9,43 [9,71-0,28] y 24,87 [22,95+1,92]  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto). Más concretamente, según  
5 los datos específicos obtenidos con semillas maduras sin desengrasar y desengrasadas, puede decirse que el contenido de compuestos fenólicos totales puede ser de  $15,85 \pm 0,21$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto (semillas maduras sin desengrasas) o  $33,52 \pm 5,79$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto (semillas maduras desengrasadas) y la capacidad reductora puede ser de  $9,71 \pm 0,28$   $\mu\text{g}$  equivalentes de  
10 ácido gálico/mg extracto (para semillas maduras sin desengrasar) o  $22,95 \pm 1,92$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto (para semillas maduras desengrasadas), aunque las variaciones debidas a posibles diferencias en el rendimiento y en los lotes de semillas utilizados dan lugar a que estos valores tengan que interpretarse como orientativos.

15

En cuanto a los compuestos presentes, destaca la presencia de esculetina, euforbetina, gaulterina, nicotiflorina (Kaempferol-3-rutinósido) y carnosol. Un extracto de la presente invención debería contener al menos uno de ellos. Como se discutió previamente en la sección de "Antecedentes de la Invención", se trata de compuestos fenólicos que han  
20 sido previamente relacionados con actividad antitumoral, pero en ensayos realizados con los compuestos de forma independiente, obtenidos a partir de casas comerciales, han sido relacionados en estudios previos con actividad antitumoral (Lee y col., 2017 and 2019; Turkekul y col., 2018; Aliebrahimi y col., 2018; HefnyGad y col., 2018). Así, es relevante destacar, por ejemplo, los estudios reportados por Lee y col. (2017), que no  
25 han sido realizados con extractos de *Euphorbia lathyris*, sino con la molécula de esculetina, lo que implica que la actividad observada no se correlaciona con la posible interacción entre los diferentes compuestos detectados en el extracto de la presente invención, interacción que puede modificar la efectividad del efecto biológico de los preparados en los que se incluye dicho extracto, siendo así impredecible su actividad.

30

Como puede verse en el Ejemplo 1, los componentes mayoritarios son esculetina, kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina) y euforbetina. La presencia en un extracto etanólico de semillas maduras de *Euphorbia lathyris* de al menos dos de estos compuestos o, preferiblemente, los tres, particularmente si están presentes también  
35 gaulterina y carnosol, y muy especialmente si la esculetina y/o el kaempferol-3-rutinósido

está presente en una concentración de los intervalos definidos por los valores mínimos y máximos de la Tabla 4 o de los valores de la Tabla 5 (es decir, para la esculetina, según la Tabla 4 los intervalos de 985,9 µg/L a 1197,2 µg/L y 2041,5 µg/L a 2325,8 µg/L peso de compuesto : volumen de extracto, todos los valores incluidos, o según la Tabla 5,  $0,4 \pm 0,05$  mg de compuesto por 100 mg de extracto o  $0,21 \pm 0,023$  mg de compuesto por 100 mg de extracto y, para el kaempferol-3-rutinósido, según la Tabla 4, los intervalos de 59,8 µg/L a 61,1 µg/L y de 188,3 µg/L a 354 µg/L, peso de compuesto : volumen de extracto, todos los valores incluidos, o, según la Tabla 5,  $0,02 \pm 0,003$  mg de compuesto por 100 mg de extracto o  $0,21 \pm 0,023$  mg de compuesto por 100 mg de extracto.

Para cualquiera de las posibilidades de definición del extracto arriba indicadas, se prefiere siempre la opción correspondiente al extracto obtenible de semillas desengrasadas y particularmente, la combinación de todas ellas.

Como puede verse en el Ejemplo 1, las definiciones del extracto etanólico de la presente invención indicadas más arriba corresponden a valores obtenidos aplicando a semillas maduras de *Euphorbia lathyris* el método de la presente invención, lo cual se prefiere para los extractos de la presente invención, particularmente para su posible uso terapéutico. Se prefieren los extractos obtenidos a partir de semillas desengrasadas mediante prensado mecánico en frío en las condiciones aplicadas para obtener los extractos obtenidos en el Ejemplo 1, particularmente si también se han aplicado las condiciones de molienda de las semillas y extracción utilizadas en dicho Ejemplo 1, incluida la extracción adicional.

Como se ha discutido más arriba, los extractos de la presente invención presentan efectos antiproliferativos frente a líneas celulares de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma, como puede comprobarse en los Ejemplos 2 a 4 de la presente solicitud, realizados sobre adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de páncreas y glioblastoma multiforme, en los que también puede verse que los valores de toxicidad encontrados permiten plantearse el uso de extractos obtenidos de semillas maduras de *Euphorbia lathyris* tanto sin desengrasar como desengrasadas, aunque se prefieren estos últimos, especialmente para adenocarcinoma de colon, incluso si es resistente a quimioterapia, como puede verse en el Ejemplo 4.

35

Así, los extractos de la presente invención pueden formar parte de la formulación de composiciones farmacéuticas, opcionalmente habiendo evaporado previamente parte o todo el etanol del extracto, composiciones que pueden tener los mismos usos terapéuticos arriba mencionados para los extractos. Dichas composiciones pueden comprender excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables y/o ser composiciones farmacéuticas combinadas que adicionalmente comprenden al menos un agente anticancerígeno adicional a los presentes en el extracto. Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser para los mismos usos arriba mencionados para los extractos. La invención, sus características y las posibles realizaciones de la misma se explican con mayor detalle y se complementan con los Ejemplos y Figuras que aparecen a continuación, que se han incluido con carácter ilustrativo y no limitativo.

### Ejemplos

15 - Ejemplo 1. Metodología de obtención del extracto etanólico y análisis

El método de obtención del extracto etanólico que se desarrolló a partir de la harina de la semilla madura tanto sin desengrasar como desengrasada de *Euphorbia lathyris*, se esquematiza en la Figura 1 y fue el siguiente:

20

1. Según el caso:

- a) Para el caso de harina sin desengrasar: Moler las semillas maduras obteniendo harina, la cual se conserva a -20°C.
- b) Para el caso de la harina desengrasada: Se realiza la separación de la parte oleaginosa de la semilla madura de la parte sólida o pellet, para lo que se emplea una prensa de extracción de aceite de semillas, serie KOMET que se caracteriza por su proceso especial de prensado en frío en el que, en lugar de tornillos de compresión individuales, se utilizan transportadores de tornillo para exprimir el aceite. En esta máquina las semillas oleaginosas se presionan suavemente sin superar los 50 grados centígrados. Con una velocidad de trabajo media de 2-3 kg de semilla a la hora y un rendimiento de conversión de aceite a semilla entre el 15-25%. Como resultado, se obtiene una torta seca de forma compacta y desengrasada. A continuación, esa torta se muele a 28.000 rpm para

25

30

obtener una harina desengrasada con un tamaño de partícula de entre 100 y 150 micras, la cual se conserva posteriormente a -20°C.

- 5 2. Pesar 5 g. de harina desengrasada en un vaso de precipitado e inmediatamente poner el vaso en hielo para trabajar a una temperatura de 4°C.
3. Añadir 15 ml de solución de extracción (etanol (EtOH) al 50% = 50 ml EtOH + 50 ml agua bidestilada + 0,2 ml ácido clorhídrico (HCl).
- 10 4. Agitar en un agitador magnético a 300 rpm.
5. Llevar a pH 2 (añadiendo HCl 6N).
- 15 6. Añadir Nitrógeno gaseoso para que no haya un ambiente oxidante y se preserven correctamente los compuestos fenólicos.
7. Dejar 30' en agitación a 4°C.
8. Centrifugar a 7000 rpm durante 5' a 4°C.
- 20 9. Recoger el sobrenadante y preservarlo a -20°C.
10. El precipitado se resuspende en 10 ml de solución de extracción y se realiza una segunda extracción siguiendo los pasos indicados anteriormente.
- 25 11. Finalmente, tras realizar las extracciones pertinentes, se juntan los sobrenadantes de cada extracción y se conserva a -20°C hasta su utilización.
12. El pellet originado en la última centrifuga se descarta.

30

Siguiendo el protocolo de extracción descrito, se obtuvieron extractos etanólicos de la harina de la semilla madura, sin desengrasar y desengrasada, de *Euphorbia lathyris*. El objetivo de este doble proceso fue comparar la actividad de los extractos retirando el alto porcentaje de compuestos lipídicos de la semilla madura sin desengrasar (ver 35 Figura 2, donde puede apreciarse la diferencia macroscópica entre ambos extractos

etanólicos en base a la diferente presencia de compuestos lipídicos) y comparar su actividad funcional frente a los extractos obtenidos de harina de semilla madura previamente desengrasada.

La Tabla 1 muestra a continuación el rendimiento, estudio de la actividad antioxidante (capacidad reductora) y compuestos fenólicos totales del extracto a partir de la harina de semilla madura, sin desengrasar y previamente desengrasada de *Euphorbia lathyris*.

Para determinar el rendimiento, el extracto etanólico se dividió en alícuotas de 1 mL para la evaporación del etanol y posterior liofilización del agua restante en el extracto. Para la eliminación del etanol de los extractos etanólicos, este se evaporó a vacío utilizando un sistema de evaporación Savant DNA 120 (Thermo Scientific) durante 60 minutos. Tras la evaporación del etanol se congelaron en nitrógeno líquido las alícuotas con el extracto restante y se procedió a su liofilización utilizando un liofilizador TELSTAR Cryodos-50 donde se mantuvieron 24 horas. Tras la liofilización se calculó el peso seco del extracto por diferencia con el recipiente que contenía cada alícuota y dicho peso seco se refirió a un volumen de 1 mL de extracto inicial, posteriormente al volumen total de extracto obtenido, y finalmente a los gramos de harina de semilla de partida para la preparación del extracto.

Los compuestos fenólicos totales se determinaron mediante la técnica de Dewanto y col. (2002) según lo descrito por Kapravelou y col. (2015) utilizando en la determinación una recta patrón de ácido gálico con concentraciones comprendidas entre 0 y 500 µg/mL.

Finalmente, la capacidad reductora de Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> por los diferentes extractos se determinó espectrofotométricamente mediante la técnica de Duh y col. (1999) según lo descrito por Kapravelou y col. (2015) utilizando en la determinación una recta patrón de ácido gálico con concentraciones comprendidas entre 0 y 500 µg/mL.

Tabla 1

30

<i>Euphorbia lathyris</i>	Rendimiento (mg/g harina)	Polifenoles totales (µg equivalente ác. Gálico/mg extracto)	Capacidad Reductora (µg equivalente ác. Gálico/mg extracto)
---------------------------	------------------------------	---	---

Harina de semilla madura sin desengrasar	42,9 ± 1,47	15,85 ± 0,21	9,71 ± 0,28
Harina de semilla madura desengrasada	117,52 ± 9,22	33,52 ± 5,79	22,95 ± 1,92

Como se puede ver en la Tabla 1, el rendimiento obtenido en relación a ambos extractos mostró una gran diferencia, siendo el rendimiento significativamente mayor y más homogéneo con la harina de semillas maduras desengrasadas (117,52 ± 9,22 mg/g harina) frente al rendimiento obtenido a partir de la harina de semillas maduras sin desengrasar (42,9 ± 1,47 mg/g harina).

La capacidad antioxidante fue analizada incluyendo estudios bioquímicos de compuestos fenólicos totales y capacidad reductora. En cuanto a compuestos fenólicos totales, los extractos de la harina de semilla madura sin desengrasar presentaron unos valores de 15,85 ± 0,21 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto, mientras que los extractos de harina de semilla madura desengrasada presentan unos valores más elevados (33,52 ± 5,79 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto), confirmando la pureza de trabajar sin compuestos lipídicos que, además, en su proceso de eliminación, no altera ni elimina los compuestos fenólicos. Las pruebas de capacidad reductora para la determinación bioquímica de la capacidad antioxidante mostraron unos valores de 9,71 ± 0,28 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto en el caso de la harina de semillas maduras sin desengrasar, y de 22,95 ± 1,92 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto para la harina de semillas maduras desengrasadas (ver Tabla 1 Por tanto, la capacidad antioxidante de los extractos preparados con harina de semilla madura desengrasada fue mayor en base a que los compuestos fenólicos se obtienen en mayor cantidad.

Los estudios cromatográficos realizados han permitido determinar los compuestos presentes en el extracto etanólico de las harinas de semillas maduras de *Euphorbia lathyris*. La técnica utilizada ha consistido en una *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) (ACQUITYH CLASSWATERS)* acoplada a un espectrómetro de masas QTOF (SYNAP G2. WATERS). En las Figuras 3 y 4 pueden observarse las gráficas de las réplicas de la cromatografía de los extractos etanólicos obtenidas, bien a

partir de la harina de semilla madura sin desengrasar (Figura 3), o desengrasada (Figura 4). Las Tablas 2 y 3 incluidas a continuación se indican los principales compuestos bioactivos identificados en cada uno de los extractos y los datos cromatográficos de cada compuesto.

- 5 Tabla 2.- Compuestos bioactivos del extracto etanólico de harina de semilla madura sin desengrasar de *Euphorbia lathyris*

Compuesto	MF	[M-H]-	TR	PPM	%Conf.
Esculetina	$C_9H_6O_4$	177,0185	2,63	-1,7	90-100
		177,0188	2,60	0,0	
Euforbetina	$C_{18}H_{10}O_8$	353,0293	3,14	-1,1	90-100
		353,0295	3,17	-0,6	
Gaulterina	$C_{19}H_{26}O_{12}$	445,1344	1,83	-0,4	90-100
		445,1353	1,82	1,6	
Carnosol	$C_{20}H_{26}O_4$	329,1744	6,11	-2,7	90-100
		329,1758	6,13	1,5	
Kaempferol-3-rutinósido	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593,1512	3,81	1,0	90-100
		593,1495	3,82	-1,9	

TR: tiempo de retención; MF: fórmula molecular; PPM: error; MS: masa;  
%Conf: porcentaje de confiabilidad

10

Tabla 3.- Compuestos bioactivos del extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasada de *Euphorbia lathyris*

Compuesto	MF	[M-H]-	TR	PPM	% Conf.
-----------	----	--------	----	-----	---------

<b>Esculetina</b>	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	177,0181	2,62	-4,0	90-100
		177,0185	2,61	-1,7	
<b>Euforbetina</b>	C <sub>18</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	353,0298	3,17	-0,6	90-100
		353,0301	3,14	1,1	
<b>Gaulterina</b>	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	445,1349	1,89	0,7	90-100
		445,1351	1,81	1,1	
<b>Carnosol</b>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	329,1744	6,10	-2,7	90-100
		329,1750	6,11	-0,9	
<b>Kaempferol-3-rutinósido</b>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593,1510	3,86	0,7	90-100
		593,1520	3,87	2,4	

TR: tiempo de retención; MF: fórmula molecular; PPM: error; MS: masa;  
%Conf: porcentaje de confiabilidad

- Entre los compuestos presentes en los extractos estudiados, tanto a partir de la harina de semilla madura, sin desengrasar como desengrasada, destacan la esculetina, euforbetina, gaulterina, nicotiflorina (Kaempferol-3-rutinósido) y carnosol. Como se discutió previamente en la sección, se trata de compuestos fenólicos que han sido previamente relacionados con actividad tumoral en ensayos realizados con los compuestos de forma independiente, sin haberse comprobado su actividad como parte de extractos de *Euphorbia lathyris*. Estos compuestos fenólicos, de forma independiente obtenidos a partir de casas comerciales, han sido relacionados en estudios previos con actividad antitumoral, sin que se hubiera realizado hasta ahora estudios con extractos de *Euphorbia lathyris*, que sí se incluyen entre los ensayos expuestos a continuación.
- Así mismo, se ha corroborado la presencia de estos compuestos y se han cuantificado mediante patrones específicos para cada uno: esculetina (Sigma-Aldrich, 68923) gaulterina (Cymitquímica,490-67-5), nicotiflorina (Cymitquímica,17650-84-9) y carnosol (Cymitquímica ,5957-80-2), destacando la carencia del patrón para euphorbetina, que siendo uno de los compuestos predominantes en el cromatograma, no se encuentra

comercializado actualmente como compuesto aislado. Los datos obtenidos se muestran a continuación en las Tablas 4 y 5.

- 5 Tabla 4.- Cuantificación (ppb:  $\mu\text{g/L}$ ) de los compuestos bioactivos de las réplicas de los extractos etanólicos de la harina de semilla madura, sin desengrasar y desengrasada de *Euphorbia lathyris* a partir de patrones conocidos.

		Ppb ( $\mu\text{g/L}$ )	
		Esculetina	Kaempferol-3-Rutinósido
Harina de semilla madura sin desengrasar de <i>E. lathyris</i>	Réplica 1	985,9	59,8
	Réplica 2	1161,3	59,8
	Réplica 3	1197,2	61,1
Harina de semilla madura desengrasada de <i>E. lathyris</i>	Réplica 1	2041,5	188,3
	Réplica 2	2131,8	327
	Réplica 3	2325,8	354

- 10 Tabla 5.- Cuantificación (mg de compuestos bioactivo por cada 100 mg de extracto) de los compuestos bioactivos de las réplicas de los extractos etanólicos de la harina de semilla madura, sin desengrasar y desengrasada, de *Euphorbia lathyris* a partir de patrones conocidos.

	Concentración mg/ml	Esculetina (mg esculetina por cada 100 mg extracto)	Kaempferol-3- Rutinósido (mg kaempferol por cada 100 mg extracto)

Harina de semilla madura sin desengrasar de <i>E. lathyris</i>	29,99 ± 4,46	0,4 ± 0,05	0,02 ± 0,003
Harina de semilla madura desengrasada de <i>E. lathyris</i>	99,59 ± 13,84	0,21 ± 0,023	0,03 ± 0,006

De estos patrones, dos aparecieron de forma mayoritaria, la esculetina y el kaempferol-3-rutinósido (ver Tabla 4). Al igual que en el rendimiento, la harina de semilla madura desengrasada contiene más cantidad de estos compuestos, apareciendo 2166,37 ppb (µg/L) de esculetina frente a los 1114.8 ppb (µg/L) de la misma en el extracto de la

5 (µg/L) de esculetina frente a los 1114.8 ppb (µg/L) de la misma en el extracto de la harina de semilla madura sin desengrasar. Lo mismo ocurre con el kamepferol, 289,78 ppb (µg/L) en el extracto de harina de semilla madura desengrasada, frente a los 60,23 ppb (µg/L) del extracto de harina de semilla madura sin desengrasar (Tablas 4 y 5).

#### 10 - Ejemplo 2. Determinación de la capacidad antitumoral de los extractos

Para determinar la capacidad antitumoral de los extractos, se cultivaron las líneas celulares T84 (línea celular humana de adenocarcinoma de colon) y HCT15 (línea celular humana de adenocarcinoma de colon resistente a quimioterapia). Como control,

15 fue seleccionada la línea CCD18 (línea celular humana no tumoral de epitelio colon).

Los extractos etanólicos fueron evaporados previamente para evitar la toxicidad que provoca el etanol sobre las líneas celulares. Además, una vez evaporados, una parte fue liofilizada para conocer la cantidad de extracto obtenido y cuantificar su

20 concentración (mg/ml) con la cual se calcularán las diferentes concentraciones que se van a testar. Los cultivos celulares fueron expuestos a concentraciones crecientes del extracto etanólico evaporado de harina de semilla madura, sin desengrasar y desengrasada, lo que permitió determinar la dosis inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) (concentración del extracto a la cual inhibe al 50% de la población celular). Los resultados obtenidos se

25 muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.- Capacidad antitumoral de los extractos a partir de harina de semilla madura, sin desengrasar y desengrasada, de *Euphorbia lathyris in vitro* a 72 horas en diferentes líneas de cáncer de colon.

<i>Euphorbia lathyris</i>	IC <sub>50</sub> (µg/mL)		
	T84	HCT15	CCD18
Extracto etanólico de harina de semilla madura sin desengrasar	11,04 ± 1,63	34,26 ± 1,1	388,36 ± 30,14
Extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasada	16,29 ± 2,54	72,9 ± 1,27	266,02 ± 18,5

T84: línea celular humana de adenocarcinoma de colon; HCT15: línea celular humana de adenocarcinoma de colon resistente a quimioterapia; CCD18: línea celular humana de colon sano. IC<sub>50</sub>: concentración que inhibe al 50% de las células.

Como puede verse en la Tabla anterior, para el extracto de semilla madura, las IC<sub>50</sub> fueron las siguientes: 11,04 ± 1,63 µg/ml en T84, 34,26 ± 1,1 µg/ml en HCT15. En el caso de la línea de colon normal CCD18, la IC<sub>50</sub> fue mucho más elevada (388,36 ± 30,14 µg/ml) indicando una menor actividad y, por tanto, toxicidad en este tipo celular en comparación con las tumorales.

Para los extractos a partir de harina de semilla madura desengrasada, las IC<sub>50</sub> fueron: 16,29 ± 2,54 µg/ml en T84, 72,9 ± 1,27 µg/ml en HCT15 y 266,02 ± 18,5 µg/ml en CCD18.

A la vista de los resultados, observamos que tanto el extracto de la harina de semilla madura, sin desengrasar como desengrasada, poseen una gran actividad antiproliferativa siendo las IC<sub>50</sub> muy bajas, independientemente de si la harina de semilla madura esta sin desengrasar o desengrasada, por lo que el proceso de desengrasado no afecta a la capacidad antitumoral del extracto obtenido. Es destacable en ambos casos, la diferencia existente entre las IC<sub>50</sub> de las líneas tumorales (T84 y HCT15) y la línea no tumoral (CCD18), siendo esta última mucho mayor que las tumorales.

Debido a que tanto los extractos de la harina de semilla madura, tanto sin desengrasar como desengrasada, poseen una actividad antitumoral similar, pero los extractos de

harina semilla madura desengrasada tienen mayor rendimiento y mayor concentración de compuestos fenólicos, hemos usado el extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasada para llevar a cabo el resto de las pruebas moleculares que se detallan a continuación.

5

Por último, y en base a los resultados previos, el extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasada, seleccionada para realizar el resto de las pruebas moleculares, se testó en líneas celulares de glioblastoma multiforme y de adenocarcinoma pancreático, dos de los tipos de cáncer más agresivos, con peor pronóstico y para los que existen pocas posibilidades terapéuticas. Para ello, se cultivaron las líneas celulares A-172 (línea celular humana de glioblastoma), SF-268 y SK-N-SH (líneas celulares humana de glioblastoma resistente a quimioterapia), así como la línea celular Panc-1 (línea celular humana de adenocarcinoma pancreático). Utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente, se determinaron las  $IC_{50}$  de las líneas celulares objeto de estudio. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

10

15

Tabla 7.- Resultados del empleo de extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasada, testado en líneas celulares de glioblastoma multiforme y de adenocarcinoma pancreático

<i>Euphorbia lathyris</i>	$IC_{50}$ (ug/ml)			
	SF-268	SK-N-SH	A-172	Panc-1
Extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasada	39,33 ± 13,2	71,42 ± 13,6	18,58 ± 1,64	185,76 ± 25,8

20

A-172 (línea celular humana de glioblastoma), SF-268 y SK-N-SH (líneas celulares humana de glioblastoma resistente a quimioterapia), así como la línea celular Panc-1 (línea celular humana de adenocarcinoma pancreático).

25

Así, la  $IC_{50}$  en las líneas celulares humanas de glioblastoma fueron: 39,33 ± 13,2 µg/ml en SF-268, 71,42 ± 13,6 µg/ml en SK-N-SH y 18,58 ± 1,64 µg/ml en A-172 mientras que en la línea derivada de adenocarcinoma pancreático Panc-1, la  $IC_{50}$  fue de 185,76 ± 25,8 µg/ml. Estos resultados permitieron concluir que el extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasada, además de presentar una gran capacidad antitumoral

frente al cáncer de colon, también posee una elevada actividad antitumoral frente a las líneas celulares de glioblastoma y de adenocarcinoma pancreático.

- Ejemplo 3.- Estudio molecular de proteínas relacionadas con muerte celular

- 5 Para dilucidar los mecanismos por los que actúan los extractos de la presente invención, se ha estudiado por Western Blot la vía de muerte celular (apoptosis) mediada por caspasas, principalmente, la caspasa 8 (vía extrínseca), caspasa 9 (vía intrínseca) y caspasa 3, usando como control endógeno  $\beta$ -actina.
- 10 Para ello, células de la línea tumoral de colon (T84) fueron cultivadas con una IC50 del extracto etanólico obtenido a partir de harina de semilla madura desengrasada y una vez pasadas 72 horas, las células fueron recogidas para proceder a la extracción proteica.
- 15 Para llevar a cabo el ensayo de Western Blot, 40  $\mu$ g de proteína de las células tratadas con el extracto etanólico, así como de las células control, fueron cargadas en un gel de poliacrilamida de electroforesis SDS-PAGE en una Mini Protean II cell (Bio-Rad, Hercules, CA). Una vez separadas las proteínas por electroforesis, estas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a la que se le suministró 20V a temperatura ambiente durante 1h. Estas membranas fueron tratados con solución de bloqueo (PBS-Tween + 5% leche en polvo) durante 1 hora para posteriormente, tras 2 lavados con PBS-Tween, incubarlos con el anticuerpo primario [rabbit polyclonal IgG anti-caspasa-3 (dilución 1:500), anti-caspasa-8 (dilución 1:1000) y anti-caspasa-9 (Dilución 1:1000); Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Se deja en incubación toda la noche a 4°C.
- 20 Transcurrido el tiempo de incubación, se realizan dos lavados y se incuba durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario peroxidasa conjugada. Finalmente, las proteínas son detectadas mediante ECL (enhanced chemiluminescence) (Bonnus, Amersham, Little Chalfont, UK) (Ortíz y col. 2009)
- 25
- 30 Una vez realizado el Western Blot (ver Figura 5), se analizaron las bandas obtenidas en los geles, mediante un software analítico llamado Quantity One Bio-Rad, confirmándose que el extracto etanólico de la harina de semilla madura desengrasada de *Euphorbia lathyris* produce apoptosis celular mediada por la vía de las caspasas, siendo expresada hasta cuatro veces más que el control (Figura 6).

35

Por tanto, podemos concluir que el extracto etanólico procedente de semillas desengrasadas produce muerte celular por apoptosis, tanto por vía intrínseca como extrínseca.

5 - Ejemplo 4. Determinación de la capacidad de migración de las células tumorales

Para determinar la capacidad de migración de las células tumorales, y por tanto, su invasividad y capacidad de generar metástasis, se ha realizado un ensayo de migración *in vitro*. Para ello, se sembraron en placas de doce pocillos células de la línea tumoral de colon T84 en una confluencia del 100%. A las 24 horas se realiza la brecha o “herida”  
10 manualmente con una punta estéril. Esta brecha consiste en generar, en el pocillo, un espacio libre de células (brecha) en mitad de una monocapa celular y poder observar y cuantificar sobre él el desplazamiento celular (Grada y col, 2017). Una vez llevado a cabo y comprobado que la brecha está libre de células, se cambia a medio sin suero  
15 bovino fetal para que las células que se encuentran alrededor de la brecha dejen de multiplicarse y se añade una dosis no citotóxica del extracto etanólico a partir de la harina de semilla madura desengrasada por triplicado. Se realizan fotos a diferentes tiempos (0, 8, 24, 48 y 72 horas) para observar la migración celular, comparándolo con el control (células sin tratamiento). Imágenes de los resultados obtenidos pueden  
20 observarse en la Figura 7.

Para evaluar el efecto del extracto etanólico, se calcula el porcentaje de migración midiendo el área de la brecha que aún queda libre de células tumorales a los diferentes tiempos en los que se han tomado las imágenes mediante el programa informático  
25 Image J.

Tras la realización del ensayo, se puede concluir que, a dosis no citotóxicas del extracto, las células tumorales de colon migran significativamente menos que los controles, y por tanto, el extracto de la presente invención, a dosis no citotóxicas, ralentizaría  
30 significativamente la invasividad y la formación de metástasis. De hecho, ya a las 8 horas el ralentizamiento de la migración de las células tumorales expuestas a dosis no citotóxicas del extracto de la presente invención era evidente significativamente. A las 72 horas, con la finalización del experimento, esta disminución fue mayor, disminuyendo de un 79% de migración en los controles a un 60% con el extracto, disminuyendo cerca  
35 de un 20% (Figura 8).

**Referencias bibliográficas**

- Aliebrahimi S, Kouhsari S, Arab S, Shadboorestan A, Ostad S. Phytochemicals, withaferin A and carnosol, overcome pancreatic cancer stem cells as c-Met  
5 inhibitors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 106:1527-1536.
- Amin A, Kucuk O, Khuri F, Shin D. Perspectives for Cancer Prevention With Natural Compounds. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(16):2712-2725.
- Berman B. New developments in the treatment of actinic keratosis: focus on ingenolmebutate gel. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2012;111.
- 10 Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Lasota M, Coebergh J et al. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995–99: results of the EUROCARE-4 study. *The Lancet Oncology*. 2007;8(9):773-783.
- Bicchi C, Appendino G, Cordero C, Rubiolo P, Ortelli D, Veuthey JL. HPLC-UV and HPLC-positive-ESI-MS analysis of the diterpenoid fraction from caper spurge  
15 (*Euphorbia lathyris*) seed oil. *Phytochem Anal*. 2001; 12(4):255-62.
- Cruz L, de Oliveira T, Kanunfre C, Paludo K, Minozzo B, Prestes A et al. Pharmacokinetics and cytotoxic study of euphol from *Euphorbia umbellata* (Bruyns) Pax latex. 2018.
- Dewanto V, Wu X, Adom KK and Liu RH, Thermal processing enhances the nutritional  
20 value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50:3010–3014 (2002).
- Duan FP, Wang YZ, Li CX. Chemical composition and biological activity analysis of semen *euphorbiae* petroleum ether extracts. *J. Chem. Pharm. Res*. 2014; 6, 745-749.
- 25 Duh PD, Tu YY and Yen GC, Antioxidant activity of the aqueous extract of harn jjur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensm-Wiss Technol* 32:269–277 (1999).
- Evans F, Taylor S. Pro-inflammatory, tumor-promoting and anti-tumor diterpenes of the plant families euphorbiaceae and thymelaeaceae. *ChemischerInformationsdienst*. 1984;15(11).
- 30 Fan L, Zhu H, Tao W, Liu L, Shan X, Zhao M, Sun D. Euphorbia factor L2 inhibits TGF- $\beta$ -induced cell growth and migration of hepatocellular carcinoma through AKT/STAT3. *Phytomedicine*, 2019, 62:152931.
- Franceschi S, Wild C. Meeting the global demands of epidemiologic transition - The indispensable role of cancer prevention. *Molecular Oncology*. 2012;7(1):1-13.

- Goyal S, Gupta N, Chatterjee S, Nimesh, S. Natural Plant Extracts as Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Cancer. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2017; 17(2):96-106.
- Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *J Invest Dermatol*. 2017;137(2): e11-e16. doi: 10.1016/j.jid.2016.11.020
- Hargreaves BJ. Succulents of Malawi. *Society of Malawi Journal* 1968;31: 31–44.
- HefnyGad M, Tuenter E, El-Sawi N, Younes S, El-Ghadban E, Demeyer K et al. Identification of some Bioactive Metabolites in a Fractionated Methanol Extract from Ipomoea aquatica (Aerial Parts) through TLC, HPLC, UPLC-ESI-QTOF-MS and LC-SPE-NMR Fingerprints Analyses. *PhytochemicalAnalysis*. 2018;29(1):5-15.
- Huang W, Cai Y, Zhang Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*. 2013;62(1):1-20.
- Jiao W y col., “Studies on chemical constituents in seeds of Euphorbia lathyris”, *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2010, vol. 51, páginas 181-187
- Kapraavelou G, Martínez R, Andrade AM, López Chaves C, López-Jurado M, Aranda P, Arrebola F, Cañizares FJ, Galisteo M, Porres JM. Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: results of in vitro and in vivo experiments. *J Sci Food Agric* 95(6):1207-1216 (2015).
- Kupchan S, Uchida I, Branfman A, Dailey R, Fei B. Antileukemic principles isolated from euphorbiaceae plants. *Science*. 1976;191(4227):571-572.
- Labianca R, Merelli B. Screening and Diagnosis for Colorectal Cancer: Present and Future. *Tumori Journal*. 2010;96(6):889-901.
- Lee R, Jeon Y, Cho J, Jang J, Kong I, Kim S et al. Esculetin exerts anti-proliferative effects against non-small-cell lung carcinoma by suppressing specificity protein 1 in vitro. *General physiology and biophysics*. 2017;36(01):31-39.
- Levey M. Medieval Arabic Toxicology: The Book on Poisons of ibn Wahshiya and Its Relation to Early Indian and Greek Texts. *Transactions of the American Philosophical Society*. 1966;56(7):1.
- Liao S, Zhan Z, Yang S, Yue J. Lathyranic Acid A: First Secolathyrane Diterpenoid in Nature from *Euphorbia lathyris*. 2005.
- Loree J, Kopetz S. Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2017;9(8):551-564.

- Meng X, Zhao X, Long Z, Yuan Y, Zhuang H, Bi K, Chen X. A sensitive liquid chromatography-mass spectrometry method for simultaneous determination of three diterpenoid esters from *Euphorbia lathyris* L. in rat plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2013; 72:299-305.
- 5 Nam, AK, Lee, SK. Evaluation of cytotoxic potential of natural products in culture human cancer cells. *Nat. Prod. Sci.* 2000; 6, 183-188
- Nambudiri N, Nambudiri V. *Euphorbia peplus*: 18th-Century Insights on a 21st-Century Therapy. *JAMA Dermatology.* 2013;149(9):1081.
- Ortiz R, Prados J, Melguizo C, et al. The cytotoxic activity of the phage E protein suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. *J Mol Med (Berl).* 10 2009;87(9):899-911. doi:10.1007/s00109-009-0493-9
- Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ. Investigación de plantas de importancia médica. Ed. IV. Universidad autónoma de nuevo León, México. 2016; ISBN: 978-84-94673-7-0.
- 15 Sdayria J, Rjeibi I, Feriani A, Ncib S, Bouguerra W, Hfaiedh N et al. Chemical Composition and Antioxidant, Analgesic, and Anti-Inflammatory Effects of Methanolic Extract of *Euphorbia retusa* in Mice. *Pain Research and Management.* 2018; 2018:1-11.
- Shi Q, Su X, Kiyota H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. *Chemical Reviews.* 2008; 108:4295–4327.
- 20 Silva V, Rosa M, Tansini A, Oliveira R, Martinho O, Lima J et al. In vitro screening of cytotoxic activity of euphol from *Euphorbia tirucalli* on a large panel of human cancer-derived cell lines. 2018.
- Stannard, J. A fifteenth-century botanical glossary. *Isis* 1964;55: 353–367.
- 25 Teng Y, Wang Y, Hsu P, Xin G, Zhang Y, Morris-Natschke S et al. Mechanism of action of cytotoxic compounds from the seeds of *Euphorbia lathyris*. *Phytomedicine.* 2018; 41:62-66.
- Thapliyal A, Krishen R, Chandra A. Overview of Cancer and Medicinal Herbs used for Cancer Therapy. *Asian Journal of Pharmaceutics.* 2018;12(1).
- 30 Turkecul K, Colpan R, Baykul T, Ozdemir M, Erdogan S. Esculetin Inhibits the Survival of Human Prostate Cancer Cells by Inducing Apoptosis and Arresting the Cell Cycle. *Journal of Cancer Prevention.* 2018;23(1):10-17.
- Vasas A, Hohmann J. *Euphorbia* Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008–2012). *Chemical Reviews.* 2014;114(17):8579-8612.

- Wang CJ, Hsieh YJ, Chu CY, Lin YL, Tseng TH. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculentin. *Cancer Lett.* 2002; 183:163-8.
- Wang Q, Zhen YQ, Gao F, Huang S, Zhou XL. Five new diterpenoids from the seed of *Euphorbia lathyris*. *Chem Biodivers.* 2018.
- 5 Wong F, Chai T, Xiao J. The influences of thermal processing on phytochemicals and possible routes to the discovery of new phytochemical conjugates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2018:1-6.
- Zhang L, Wang C, Meng Q, Tian Q, Niu Y, Niu W. Phytochemicals of *Euphorbia lathyris* L. and Their Antioxidant Activities. *Molecules.* 2017; 22(8). pii: E1335.
- 10 Zhu A, Zhang T, Wang Q. The phytochemistry, pharmacokinetics, pharmacology and toxicity of *Euphorbia semen*. 2018.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de obtención de un extracto vegetal etanólico procedente de harina de semillas maduras de *Euphorbia lathyris*, que comprende las etapas de:
- 5 a) moler la semilla para obtener harina;
- b) extraer la harina de la etapa a) mediante una solución de extracción hidroalcohólica en frío y a pH ácido,
- c) opcionalmente, desengrasar la semilla madura mediante prensado mecánico en frío antes de realizar las etapas a) y b).
- 10
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que:
- a) la semilla se muele hasta obtener harina con un tamaño de partícula de entre 100  $\mu\text{m}$  y 150  $\mu\text{m}$ ; y
- b) la harina obtenida en la etapa a) se extrae con la solución de extracción
- 15 en las siguientes condiciones de operación:
- i. temperatura igual a 4 °C,
- ii. en atmósfera de nitrógeno,
- iii. la solución de extracción se compone de etanol, agua bidestilada y ácido clorhídrico en proporciones 50 : 50 : 0,2 en volumen,
- 20 iv. pH igual a 2, y/o
- v. la mezcla de la harina y la solución de extracción se mantiene en agitación durante 30 minutos tras haber alcanzado las condiciones i a iv,
- y donde el extracto etanólico se obtiene centrifugando la mezcla de la solución de extracción y la harina y recogiendo el sobrenadante.
- 25
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que se lleva a cabo la etapa de desengrasado de la semilla madura, a una temperatura de entre 40 a 50°C y con una velocidad de extracción de 2 a 3 kg de semilla/hora.
- 30
4. El procedimiento según la reivindicación 2 o 3, en el que:
- i) el precipitado resultante de centrifugar la mezcla de la harina y la solución de extracción se resuspende en solución de extracción,
- ii) la suspensión obtenida se mantiene de nuevo en agitación durante 30 minutos en las condiciones de la etapa b) definidas en la reivindicación 2,
- 35 iii) la suspensión se somete a centrifugación, recogándose el sobrenadante,

y

- iv) el extracto etanólico resulta de mezclar el sobrenadante obtenido en iii) con el primer sobrenadante obtenido.

- 5 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que incluye una etapa adicional final en la que se evapora parcial o totalmente el etanol del extracto etanólico obtenido.
6. Un extracto etanólico de semillas maduras de *Euphobia lathyris* con alto  
10 contenido en compuestos fenólicos.
7. El extracto etanólico según la reivindicación 6, obtenible por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 15 8. El extracto etanólico según la reivindicación 6 o 7, que presenta un contenido de compuestos fenólicos totales que oscila entre 15,64 y 39,31  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto y/o una capacidad reductora que oscila entre 9,43 y 24,87  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto.
- 20 9. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el contenido de compuestos fenólicos totales es de  $15,85 \pm 0,21$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto o  $33,52 \pm 5,79$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto y la capacidad reductora es  $9,71 \pm 0,28$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto o  $22,95 \pm 1,92$   $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto.
- 25 10. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende al menos un compuesto fenólico seleccionado del grupo de esculetina, euforbetina, gaulterina, kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina) y carnosol, o combinaciones de los mismos.
- 30 11. El extracto etanólico según la reivindicación 10, que comprende al menos dos compuestos fenólicos seleccionados del grupo de esculetina, euforbetina y kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina).
- 35 12. El extracto etanólico según la reivindicación 11, que comprende al menos los compuestos fenólicos esculetina y euforbetina.

13. El extracto etanólico según la reivindicación 11, que comprende al menos los compuestos fenólicos euforbetina y kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina).
14. El extracto etanólico según la reivindicación 11, que comprende al menos los compuestos fenólicos esculetina y kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina).
15. El extracto etanólico según la reivindicación 11, que comprende los compuestos fenólicos esculetina, euforbetina y kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina).
16. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que adicionalmente comprende al menos un compuesto fenólico adicional seleccionado del grupo de gaulterina y carnosol.
17. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, que comprende los compuestos fenólicos esculetina, euforbetina, gaulterina, kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina) y carnosol.
18. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, que comprende esculetina y donde está presente a una concentración de:
- i) entre 2041,5 µg/L y 2325,8 µg/L (p/V - peso de compuesto : volumen de extracto) y/o
  - ii)  $0,4 \pm 0,05$  mg de compuesto por 100 mg de extracto o  $0,21 \pm 0,023$  mg de compuesto por 100 mg de extracto.
19. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, que comprende, kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina) y donde kaempferol-3-rutinósido está presente a una concentración de:
- i) a una concentración de entre 188,3 µg/L a 354 µg/L (p/V - peso de compuesto : volumen de extracto), y/o
  - ii)  $0,02 \pm 0,003$  mg de compuesto por 100 mg de extracto etanólico o  $0,21 \pm 0,023$  mg de compuesto por 100 mg de extracto etanólico.
20. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 19, donde
- i) el contenido de compuestos fenólicos totales es de  $33,52 \pm 5,79$  equivalentes de ácido gálico/mg extracto y/o la capacidad reductora es  $22,95 \pm 1,92$  µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto,
  - ii) el extracto comprende los compuestos fenólicos esculetina, euforbetina,

gaulterina, kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina) y carnosol,

5           iii) la esculetina está presente a una concentración de peso de compuesto:  
volumen de extracto del intervalo de 2041,5 µg/L a 2325,8 µg/L, ambos  
valores incluidos, y/o a una concentración de 0,21 ± 0,023 mg de  
compuesto por 100 mg de extracto, y

          iv) el kaempferol-3-rutinósido (nicotiflorina) está presente a una  
concentración de peso de compuesto: volumen de extracto del intervalo  
de 188,3 µg/L a 354 µg/L, ambos valores incluidos, y/o a una  
concentración de 0,02 ± 0,003 mg de compuesto por 100 mg de extracto.

10

21. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 20, que se  
ha obtenido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

15

22. El extracto etanólico según la reivindicación 21, en la que se ha llevado a cabo la  
evaporación final, parcial o total, del etanol según se define en la reivindicación 5.

20

23. El extracto etanólico según la reivindicación 21 o 22, de semillas maduras  
desengrasadas en el que se ha llevado a cabo la etapa de desengrasar la semilla  
madura mediante prensado mecánico en frío antes de realizar la etapa a) de moler la  
semilla y la etapa b) de extraer la harina obtenida.

25

24. El extracto etanólico según la reivindicación 20, que se ha obtenido por el  
método de la reivindicación 1 en el que se ha llevado a cabo la etapa de desengrasar la  
semilla madura mediante prensado mecánico en frío en las condiciones de la  
reivindicación 3 antes de realizar las etapas a) y b); la etapa a) de moler la semilla y la  
etapa b) de extraer la harina obtenida se han llevado a cabo según se define en la  
reivindicación 2, y en el que se ha realizado una segunda extracción del precipitado  
obtenido tras ejecutar el procedimiento según se define en la reivindicación 2 siguiendo  
las condiciones definidas en la reivindicación 4.

30

25. Una composición farmacéutica que comprende en su formulación un extracto de  
una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 24.

35

26. La composición farmacéutica según la reivindicación 25, que es una composición  
farmacéutica combinada que adicionalmente comprende al menos un agente  
anticancerígeno diferente a los presentes en el extracto.

27. La composición farmacéutica según la reivindicación 25 o 26, que adicionalmente comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 5 28. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, que incluye en su formulación un extracto según la reivindicación 24.
29. Un extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 24 para su uso en el tratamiento de un tipo de cáncer que se selecciona del grupo de cáncer colorrectal,  
10 cáncer de páncreas y glioblastoma.
30. El extracto para su uso según la reivindicación 29, en el que el tipo de cáncer se selecciona del grupo de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pancreático y glioblastoma multiforme.
- 15 31. El extracto para su uso según la reivindicación 29 o 30, que es un extracto de semillas maduras desengrasadas de la reivindicación 23 o 24.
32. El extracto para su uso según la reivindicación 31, para uso en el tratamiento del  
20 adenocarcinoma de colon.
33. El extracto para uso según la reivindicación 32, para uso en el tratamiento del adenocarcinoma de colon resistente a quimioterapia.
- 25 34. Una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, para uso en el tratamiento de un tipo de cáncer que se selecciona del grupo de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma.
- 30 35. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 34, en la que el cáncer se selecciona del grupo de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pancreático y glioblastoma multiforme.
- 35 36. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 34 o 35, en la que es una composición de la reivindicación 28.
37. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 35 o 36, en el que el cáncer es adenocarcinoma de colon.
38. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 37, en la que el

cáncer es adenocarcinoma de colon resistente a quimioterapia.

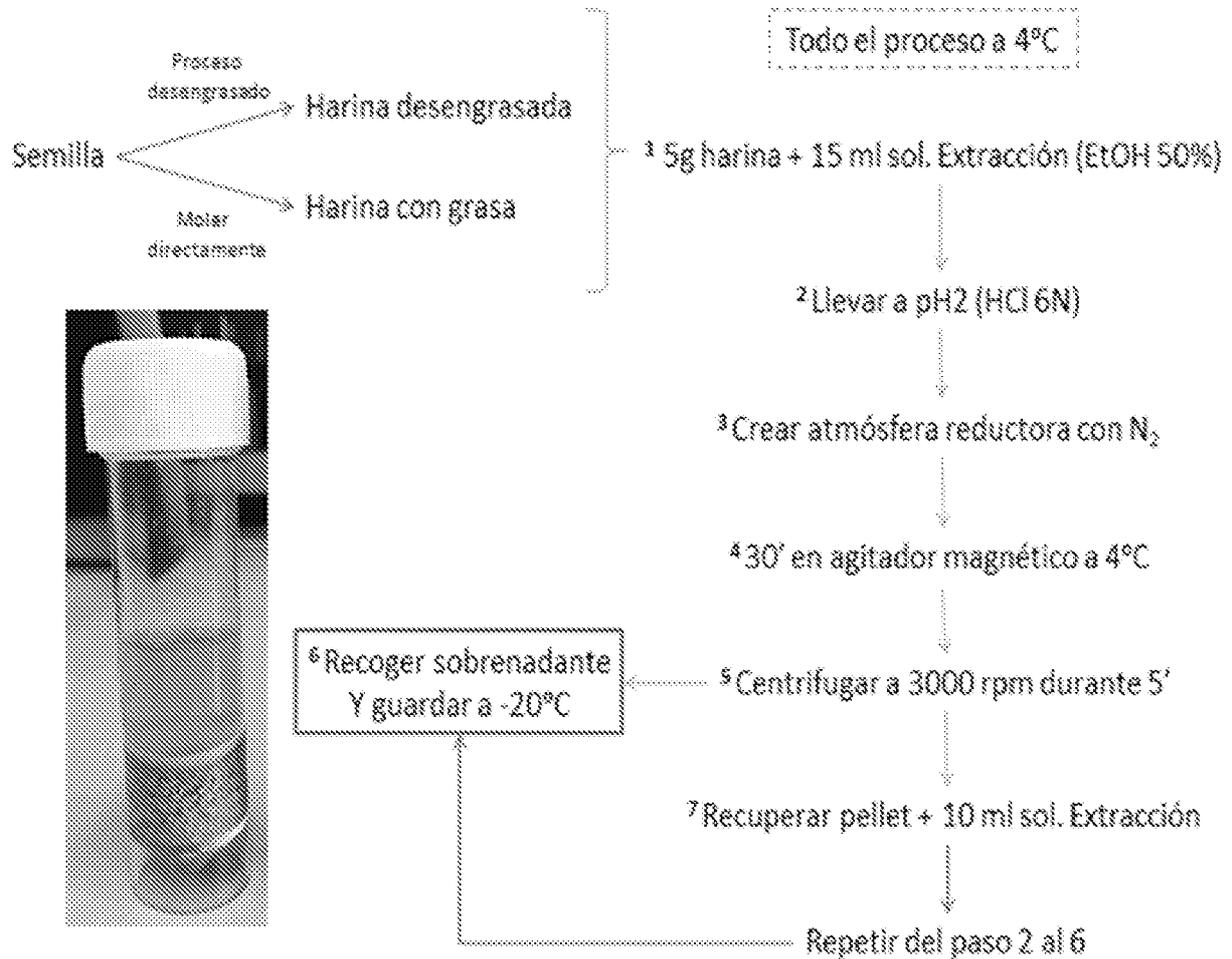


FIGURA 1

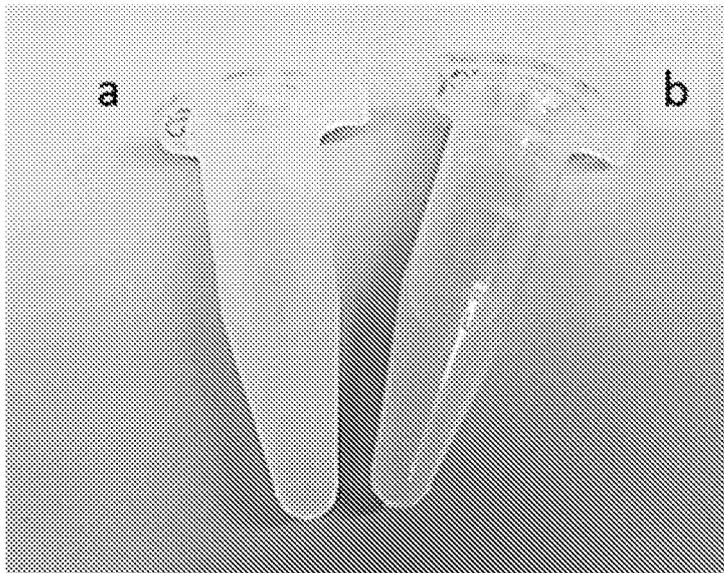


FIGURA 2

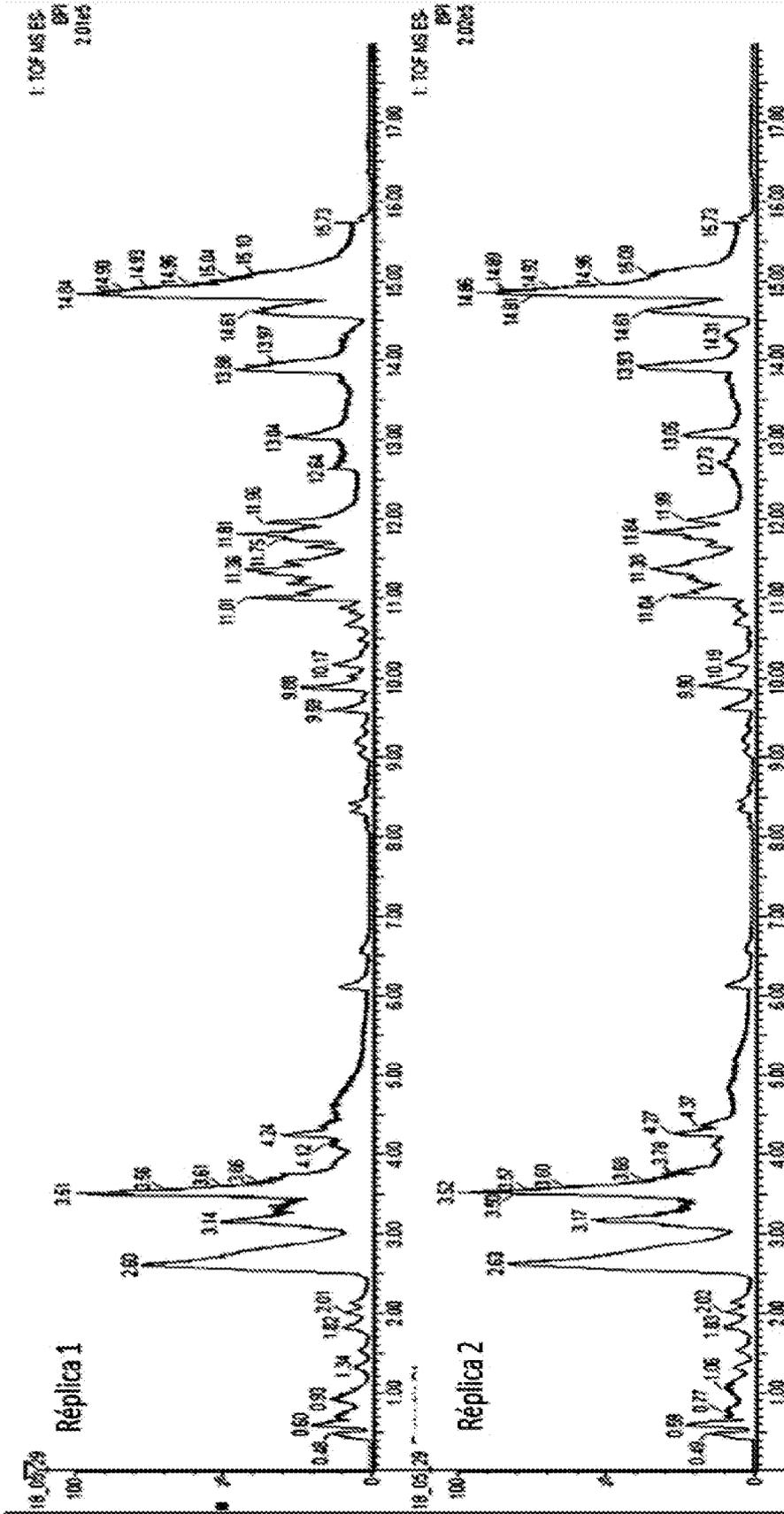


FIGURA 3

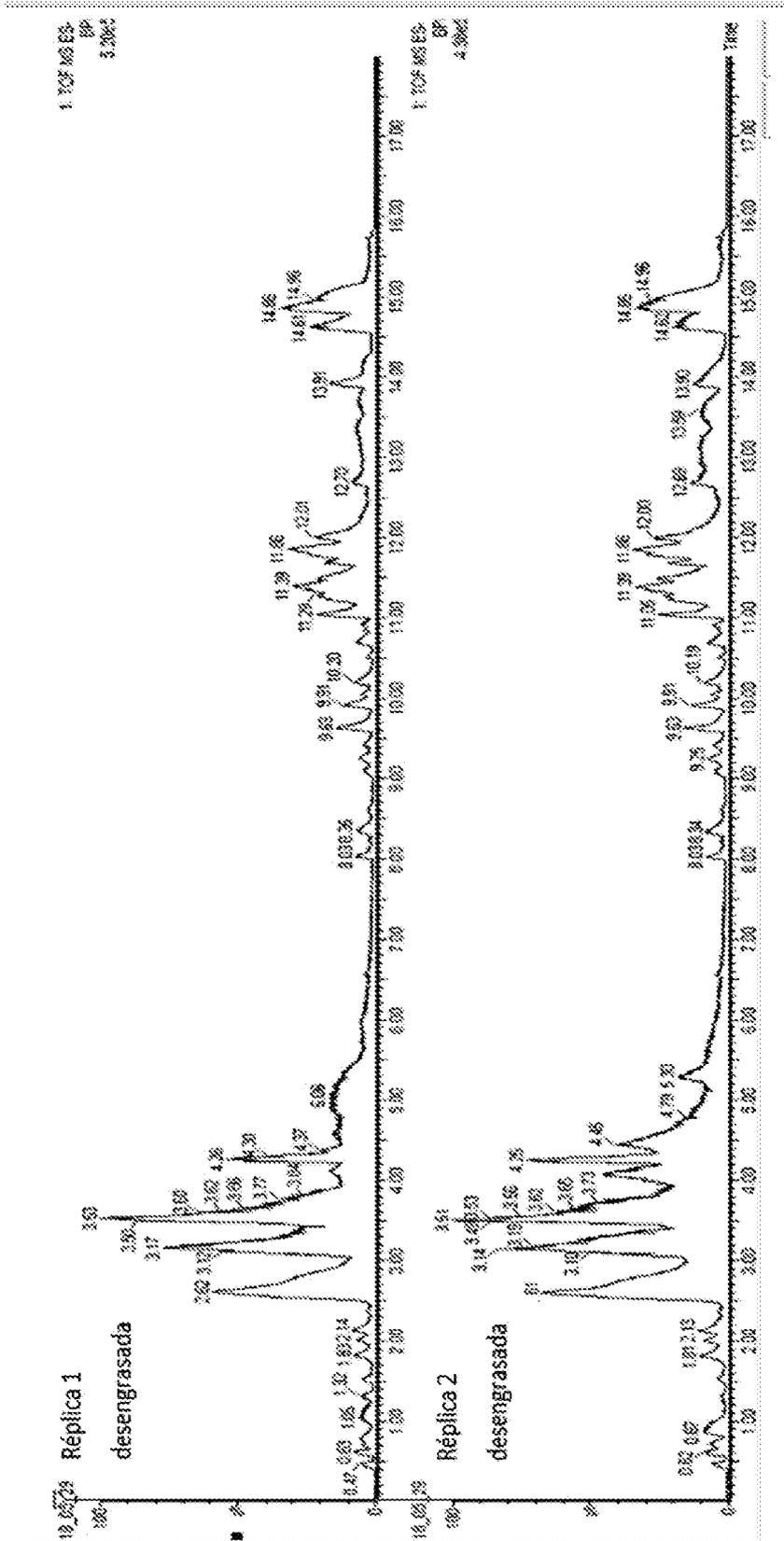


FIGURA 4

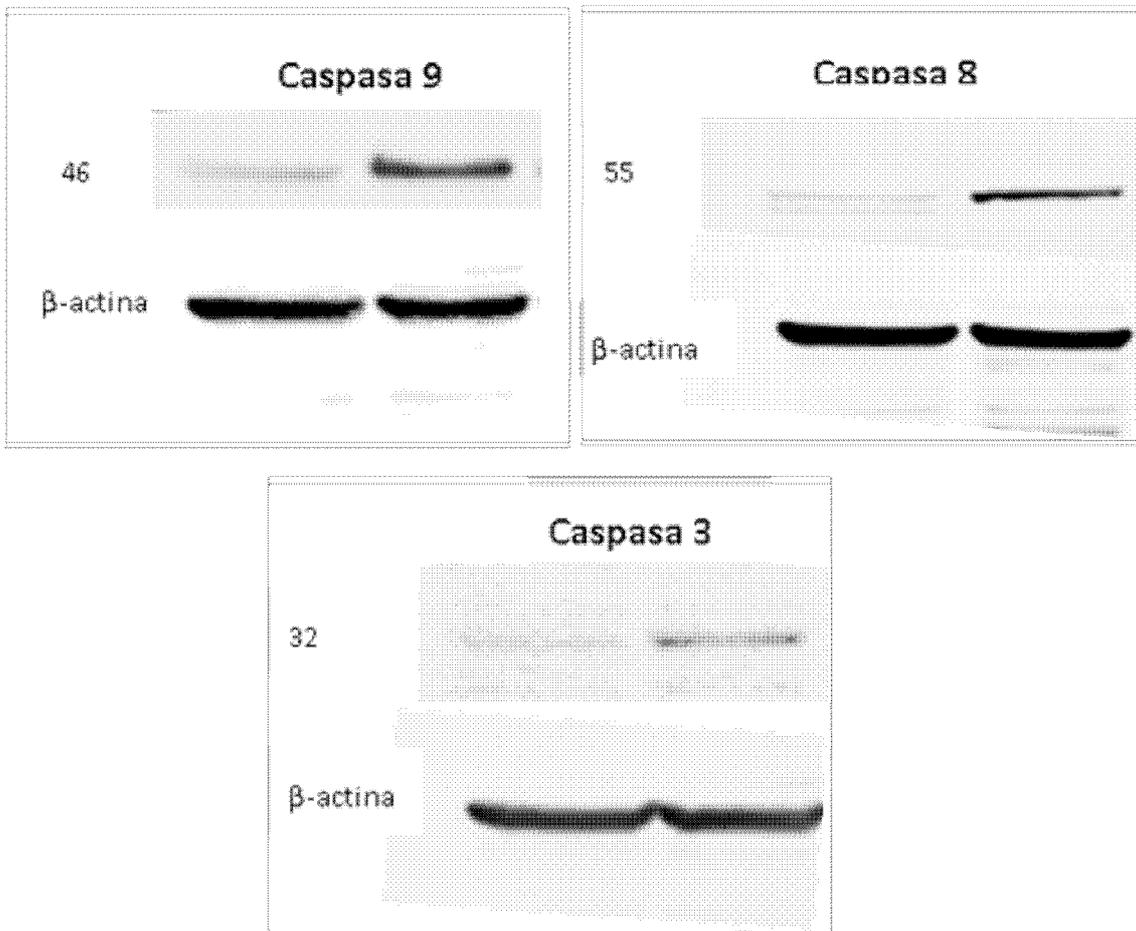


FIGURA 5

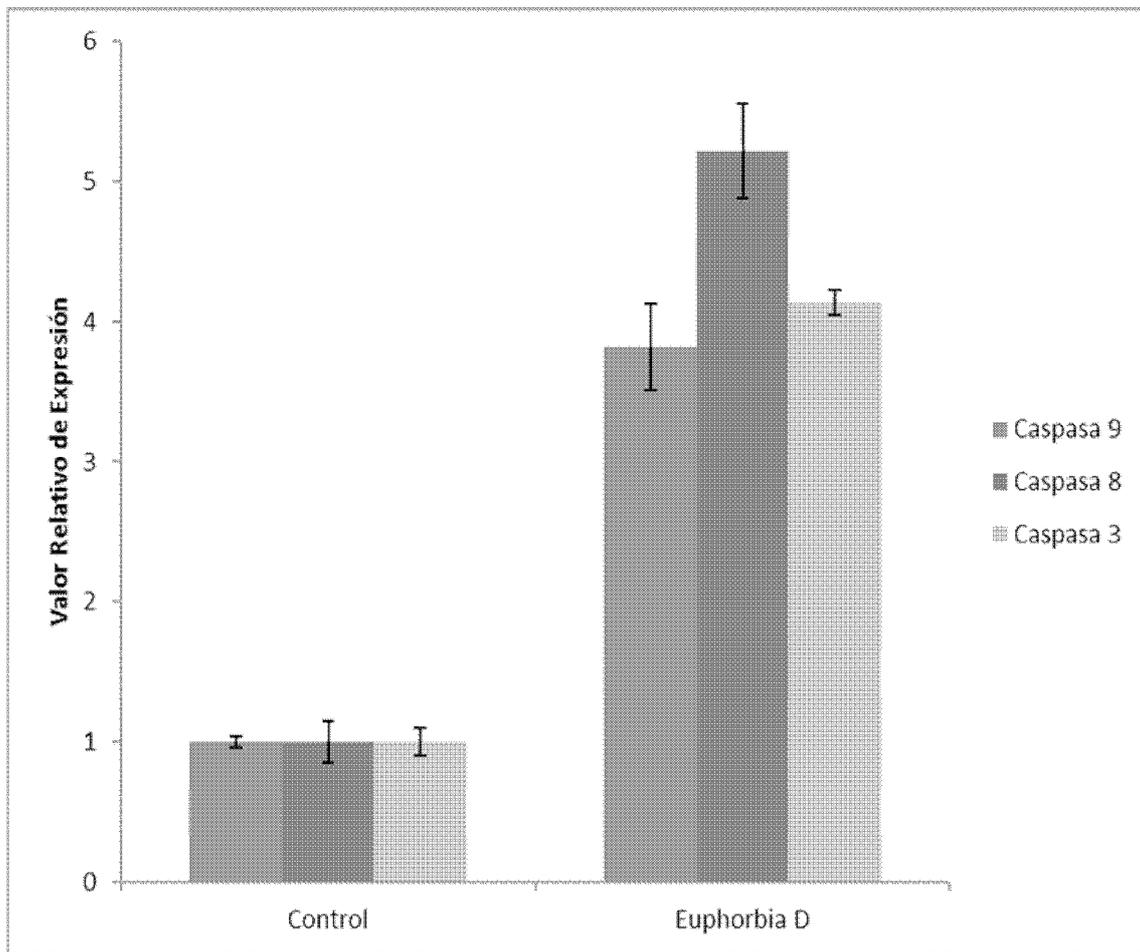


FIGURA 6

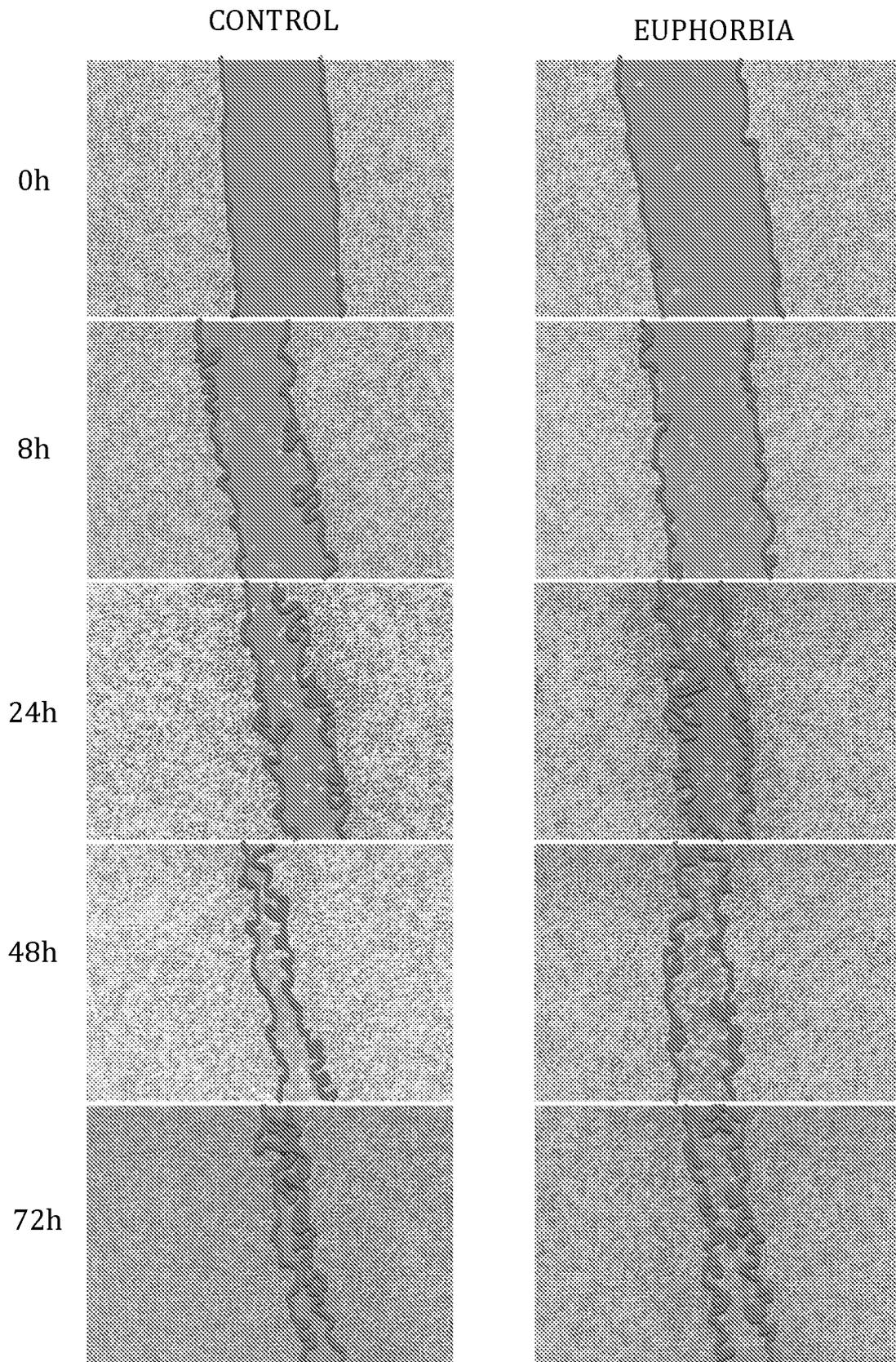


FIGURA 7

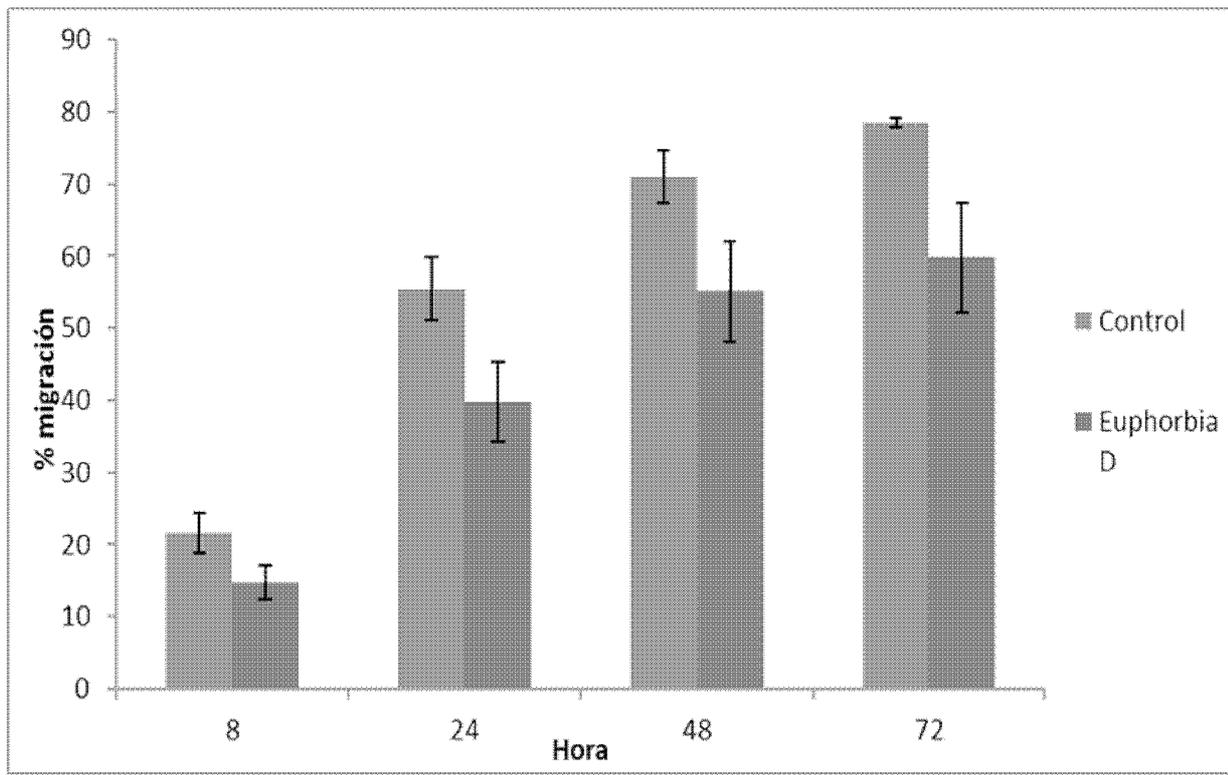


FIGURA 8