

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 476**

21 Número de solicitud: 202031035

51 Int. Cl.:

A61K 36/42 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

13.10.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.04.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

13.07.2022

Fecha de concesión:

22.09.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

29.09.2022

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:

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

74 Agente/Representante:

CAMPOS GARCÍA, Vanessa

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

57 Resumen:

Extracto etanólico de semillas de *Citrullus colocynthis*, 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 *Citrullus colocynthis*, caracterizado por extracción con una solución hidroalcohólica con etanol al 50%, a pH ácido, bajo atmósfera de nitrógeno y durante tiempos cortos, no superiores a 1 — 2 h. Los extractos obtenidos de diferentes variedades de *Citrullus colocynthis* poseen alto contenido en polifenoles y muestran una potente actividad antitumoral frente a líneas celulares de adenocarcinoma de colon y de glioblastoma, incluso frente a líneas celulares derivadas de tumores resistentes a quimioterapia, todo ello con baja toxicidad para hepatocitos humanos; también presentan actividad frente a líneas células de adenocarcinoma de páncreas. Por ello se propone el extracto de la invención para uso en el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma.

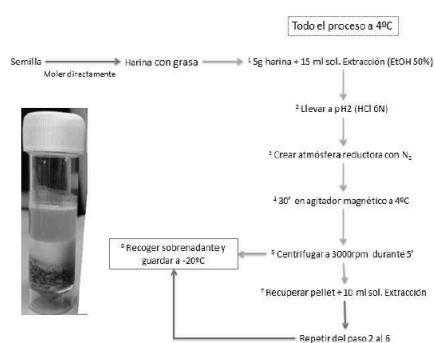


FIGURA 1

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 2 906 476 B2

DESCRIPCIÓN

Extracto etanólico de semillas de *Citrullus colocynthis*, 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, concretamente procedente de harina de semilla madura de *Citrullus colocynthis*, para ser usado como agente antitumoral.

Antecedentes de la invención

15 Actualmente, una de las patologías con mayor incidencia a nivel mundial es el cáncer, siendo este un conjunto de enfermedades caracterizadas por diversas alteraciones a nivel celular que conllevan un exceso de proliferación y supervivencia de las células malignas. Es por ello, que esta patología requiere del desarrollo de nuevos tratamientos más efectivos, especialmente en estadios avanzados de la enfermedad. Entre los diferentes tipos de
20 tumores, por su incidencia y por la falta de tratamientos efectivos en estadios avanzados, el cáncer colorrectal (CCR) es considerado un auténtico problema de salud pública.

Según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (2018) a nivel mundial, el CCR es el tercer cáncer más común y la cuarta causa de muerte por cáncer,
25 representando entre uno y dos millones de nuevos casos cada año. En España, el CCR es el tumor más frecuentemente diagnosticado (año 2019) en ambos sexos, siendo el segundo en frecuencia tanto en varones como en mujeres. En relación a su mortalidad y de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística, a fecha de diciembre de 2019, el CCR representaba el
30 segundo cáncer en importancia en cuanto al número de muertes en ambos sexos. Esta mortalidad posee una clara tendencia de crecimiento que se ha demostrado está relacionada con el estilo de vida y con la dieta.

En relación a los factores de riesgo del CCR, la edad es el principal factor que influye en este tipo de patología, diagnosticándose en personas mayores de 50 años en el 90% de los
35 casos sin otras patologías previas, clínicas ni enfermedades predisponentes. Aun así, se consideran de alto riesgo las personas que han sufrido un CCR previo, personas con

antecedentes familiares (factores genéticos o familiares), ya que en el 25% de los casos existe un antecedente familiar y en el 10% existe un componente hereditario y, personas con enfermedades predisponentes, especialmente por presencia de pólipos intestinales o con enfermedad intestinal inflamatoria. Además, cabe destacar que el consumo excesivo de alcohol, el sobrepeso y obesidad, el tabaquismo, la vida sedentaria y ciertos tipos de alimentos (factores dietéticos) como carne procesada, han sido relacionados con esta patología.

A pesar de los grandes avances en los últimos años, el tratamiento del CCR no ha conseguido resultados satisfactorios en términos de curación o de reducción de la incidencia, especialmente en estadios avanzados de la enfermedad, en la que se produce una expansión metastásica del tumor (especialmente hepática) influyendo de forma drástica en la supervivencia de los pacientes. La cirugía (si el tumor es resecable) y la quimioterapia son los principales tratamientos del CCR. La quimioterapia que se emplea actualmente está basada en diferentes citotóxicos, ya sea en monoterapia o en combinación (oxaliplatino, irinotecan, 5-fluorouracilo, capecitabina, TAS-102, raltitrexed). En los últimos años se han desarrollado fármacos biológicos activos para CCR avanzado, entre los que se encuentran los anticuerpos monoclonales cetuximab, panitumumab, bevacizumab y una proteína de fusión recombinante (aflibercept) con indicaciones muy precisas (Loree y col., 2017; Nappi y col., 2018; Bregni y col., 2020.). A pesar de ello, los resultados son muy limitados tal y como claramente indica la supervivencia media de estos pacientes (15 a 20,5 meses) (Berrino y col., 2007). La mejora de su pronóstico precisa pues, del desarrollo de nuevas estrategias que sumen la actividad terapéutica a la acción preventiva (Idrees y col., 2019; Reglero y col., 2019)

El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas abarca una gran cantidad de campos de investigación entre los que se encuentran la nanotecnología, sistemas que activan el sistema inmune y extractos de diferentes orígenes que pueden ayudar a mejorar la respuesta al tratamiento. En este contexto, la actividad de extractos o derivados vegetales sobre la viabilidad y supervivencia de células tumorales ha cobrado un gran interés en los últimos años (Goyal y col., 2017), aunque esta línea de investigación viene avalada y apoyada por el National Cancer Institute (USA) desde 1960, época en la que se comenzó a evaluar la actividad antitumoral y preventiva de diferentes extractos vegetales frente a carcinomas (Huang y col., 2013). Los vegetales, en general y sus extractos, en particular poseen grandes aplicaciones en medicina como son ser una i) fuente directa de agentes terapéuticos, ii) una 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 y 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. Así, se han identificado más de 5.000 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 sólo 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; Bonta y col., 2019). Debido a la bioactividad que presentan, existen numerosos medicamentos y patentes cuyos principales componentes son compuestos fenólicos, es decir, compuestos que presentan más de un grupo fenólico por molécula, entre los que se incluyen los flavonoides (flavonas, isoflavonas, flavononas, flavonoles, flavanoles, etc.) y sus ácidos fenólicos. Es el caso de Neumentix™, (<https://www.kemin.com/na/en-us/products/neumentix>), un suplemento patentado (patente de EEUU US 9839661), obtenido por Kemin (representada en España por Univar) a partir de la menta verde recolectada (gamas KI110 y KI42) tras un proceso de secado. Este suplemento rico en compuestos fenólicos del tipo ácido rosmarínico, salvianólico y caftarico ha demostrado, mediante estudios clínicos, grandes beneficios en el rendimiento cognitivo. 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™ (mezcla de extractos de arándanos y uva) de Douglas Laboratories® (Valencia, España: <https://www.douglaslabs.es/>). También existen comercializados extractos polifenólicos patentados obtenidos 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 (Eminol®) 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.

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 (Rivas-Morales y col., 2016; Wong y col., 2018).

La familia *Cucurbitaceae* es uno de los grupos de vegetales que está recibiendo atención para la identificación y aislamiento de compuestos con posible interés en distintos campos de la industria, incluida la industria farmacéutica. Dicha familia incluye géneros como *Cucurbita* (al que pertenecen las calabazas provenientes del continente americano), así como otros géneros tal como el género *Citrullus*, que es un género pequeño que comprende 4 especies aceptadas, entre las que destaca la sandía (*Citrullus lanatus*) por su importancia alimenticia, y que también están siendo objeto de estudio para la obtención de extractos y compuestos bioactivos. En el documento de patente española ES2394250B1, por ejemplo, puede verse que la Universidad Politécnica de Cartagena, ha patentado el procedimiento para la obtención de extracto rico en L-citrulina a partir de cucurbitáceas, como la sandía, para su uso en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. En este caso en particular, el extracto se obtiene a partir de la corteza, mediante su molienda, dilución acuosa, un proceso enzimático y posteriormente fases de agitación, centrifugación y filtración. Finalmente obtienen un extracto seco, el cual reconstituyen con agua Milli-Q y obtienen la L-citrulina.

Otra de las cucurbitáceas que está siendo objeto de interés como posible fuente de compuestos bioactivos es la planta conocida como tuera (*Citrullus colocynthis*), que se conocía antiguamente como calabaza silvestre, y la que en la actualidad también se la denomina coloquintida o coloquinta. Se trata de una especie que crece bien en ambientes áridos, ya que exhibe resistencia de alto nivel al estrés hídrico y la salinidad. Por otro lado, su sabor amargo y su potente efecto laxante hacen que no sea comercial actualmente, aunque se han buscado usos comerciales para la misma, alimentarios y no alimentarios, a partir del estudio de los compuestos presentes en partes de la planta, principalmente el fruto pero también las semillas, estudios que en muchos casos implican la obtención de extractos. Es el caso del estudio comparativo realizado con el aceite de las semillas de *Citrullus*

colocynthis, que ha sido objeto de un estudio comparativo con el aceite de semillas de girasol (Nehdi y col., 2012), en el que se examinó el contenido de ácidos grasos y su capacidad antioxidativa, concluyendo que dicho aceite puede utilizarse en aplicaciones alimentarias y no alimentarias, sustituyendo a los aceites convencionales. El estudio incluye el uso de un procedimiento para la obtención de extractos de semillas de *Citrullus colocynthis* con etanol al 40% a 65°C durante 80 minutos en un agitador de baño de agua y temperatura controlada, en el que los extractos se filtran con papel de filtro y se usan directamente para estimar las propiedades antioxidantes del extracto.

La tuerca ha sido usada en medicina tradicional durante siglos para tratar diferentes patologías, como la parálisis y obstrucción intestinal, así como enfermedades hepáticas, por lo que se han hecho estudios sobre extractos de dicha planta, o de partes de la misma, para encontrar posibles efectos terapéuticos de dichos extractos o de compuestos presentes en ella. Gran parte de los estudios se han realizado sobre los frutos, aunque pueden encontrarse algunos estudios realizados sobre semillas u otras partes de la planta, como las hojas.

Respecto al uso tradicional como tratamiento contra la tuberculosis, Mehta y col. (2013) han corroborado esta actividad antibacteriana frente a la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* mediante un extracto metanólico a partir de la parte aérea y los frutos maduros sin semillas de la tuerca. Además, existen numerosos estudios que avalan la actividad antibacteriana que presentan los extractos de este fruto, como la actividad del extracto alcohólico del fruto de la tuerca frente a *Mycobacterium smegmatis* (Sharma y col., 2010).

Además de su actividad antimicrobiana, también posee efecto analgésico y antiinflamatorio (Marzouk y col., 2010). Este efecto antiinflamatorio y analgésico se corroboró mediante una extracción metanólica por maceración a partir de semillas de secas *Citrullus colocynthis*, mediante un procedimiento en el cual las semillas, tras ser finamente pulverizadas, se sumergieron en metanol y se extrajeron cuatro veces por maceración a temperatura ambiente durante 8 días. El extracto crudo se filtró y luego se evaporó a presión reducida a 40°C. El extracto de metanol finalmente se desengrasó con éter de petróleo para, tras eliminar el disolvente de la solución, obtener una fracción oleosa y un residuo metanólico (Marzouk y col., 2011).

Además de la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria, también se asocian al extracto del fruto de la tuerca otras diversas actividades, tales como actividad antiviral e incluso

anticancerígena, habiéndose relacionado estas actividades con la presencia de compuestos fenólicos en su fruto.

Se han llevado distintos estudios anticancerígenos y antiangiogénicos a partir de extractos de la pulpa del fruto de la tuerá. Gupta y col. (2019) llevaron a cabo una extracción a partir del fruto liofilizado de la tuerá mediante un extractor soxhlet con éter de petróleo, seguida de una extracción hidro-etanólica y finalmente con agua destilada. Con este extracto a partir del fruto han demostrado su actividad anticancerígena frente a células tumorales de linfoma en virtud de su capacidad antioxidante, la eliminación de radicales libres y la citotoxicidad tumoral probablemente debida a la presencia de numerosos fitoconstituyentes como: glicósidos, alcaloides, flavonoides, fenoles, diterpenos, etc.

Puede encontrarse también un estudio que se refiere a los efectos anticancerígenos de extractos de *Citrullus colocynthis*, mostrando que se presentan a través de una variedad de vías, incluida la activación de vías apoptóticas, inhibición de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, antiangiogénesis y efectos antimetastásicos, destacando la importancia de futuros estudios más precisos para la adecuada aplicación de los compuestos de *Citrullus colocynthis* tras su extracción (Abdulridha y col., 2020).

Respecto a la antiangiogénesis en particular, existen estudios recientes que muestran que el extracto obtenido a partir del fruto de tuerá suprime la angiogénesis (Gaikward y col., 2019), un efecto que dificulta que los tumores desarrollen nuevos vasos sanguíneos. En este estudio, los ensayos se llevaron a cabo con un extracto de frutos que contenían las semillas obtenido con acetato de etilo, el cual suprimió la angiogénesis. Atribuyeron este poder a su alto contenido en quercetina y además, al efecto sinérgico de este compuesto con los demás fitoconstituyentes presentes en el extracto.

La solicitud de patente internacional WO2018055492A1, por su parte, describe extractos etanólicos de distintas plantas (nos semillas) entre las que se encuentra *Citrullus colocynthis*, cuyos compuestos pueden usarse para prevenir, tratar, mejorar o reducir la incidencia de diversos estados o afecciones de enfermedades cancerosas mediante la administración de una cantidad eficaz del extracto.

Otra solicitud de patente relacionada con este género es la WO2007116404A2, en la que se describe una extracción con cloroformo/metanol a partir de las hojas frescas de *Citrullus colocynthis*, siendo una de las fracciones extraídas ricas en cucurbitacina B y cucurbitacina

E. Estos se emplean para el tratamiento del cáncer de mama.

Como puede observarse existen numerosos estudios sobre las posibles aplicaciones terapéuticas del fruto de *Citrullus colocynthis*, entre ellos estudios que avalan la actividad antitumoral del mismo pero, sin embargo, son más escasos los estudios sobre la posible aplicaciones terapéuticas de las semillas y de la actividad de los compuestos presentes en sus extractos.

Además del estudio para estimar las propiedades antioxidantes del extracto etanólico (40%) de semillas de *Citrullus colocynthis* antes citado (Nehdi y col., 2012), se han llevado a cabo estudios sobre los compuestos fitoquímicos presentes en diferentes extractos de semillas y su capacidad antioxidante relacionada con la captura y retirada de radicales libres (Benariba y col., 2013). El estudio se realizó con semillas secas y conservadas protegiéndolas de la luz, de las que se obtuvieron extractos acuosos, hidrometanólicos, de acetato de etilo y de n-butanol, algunos de los cuales requirieron un desengrasado previo con hexano. En el caso del extracto hidrometanólico en concreto, las semillas molidas y desengrasadas se extrajeron tres veces a reflujo en 100 ml de una mezcla de agua y metanol (30/70, v/v), recuperando la solución sobrenadante resultado de la filtración y la centrifugación y evaporándola a sequedad. Los extractos obtenidos mostraron un alto contenido fenólico en general (especialmente el extracto hidrometanólico) y de flavonoides en particular (destacando el extracto de acetato de etilo), observándose claras diferencias en los valores obtenidos según el método de extracción utilizado. Los extractos mostraron una alta capacidad antioxidante, en particular, los extractos acuosos (de semillas sin desengrasar), hidrometanólico y de acetato de etilo, cuya capacidad antioxidante fue en todos ellos superior al 65% de la obtenida con ácido ascórbico, llegando al 88,8% en el caso del extracto de acetato de etilo. Esta capacidad antioxidante se atribuyó a los compuestos químicos presentes en la planta tales como los flavonoides.

Estudios previos (Benariba y col., 2012) sobre posibles efectos beneficiosos respecto a la tolerancia a la glucosa, el peso corporal, la grasa acumulada en distintos órganos y distintos parámetros bioquímicos sanguíneos, realizados con extractos de semillas de *Citrullus colocynthis* en modelos animales de diabetes mellitus tipo I, indicaron que los extractos obtenidos con agua o con n-butanol parecen buenos candidatos para identificar compuestos o componentes de los extractos, adecuados para el tratamiento de la diabetes En la misma línea, existe también un estudio realizado con un extracto acuoso de las semillas secas en el que se evaluó, *in vivo*, la hiperglucemia, mejorándola en ratones (Amin y col., 2017).

En cuanto a la actividad anticancerígena, son escasos los estudios con extractos de semillas de *Citrullus colocynthis*. Existe un estudio en el que describen que los extractos de semillas y de pulpa de *Citrullus colocynthis* son efectivos contra varias líneas celulares de cáncer, mientras que las células normales, con una tasa de división más baja, no se ven afectadas en gran medida. Estos extractos, cuyos compuestos principales son colocínticos (isoorientina e isovitexina), actúan a través de la regulación de las vías p53 y el modo de apoptosis es principalmente a través de la vía mitocondrial (Joshi y col., 2019).

10 Como puede observarse, existen numerosos estudios que avalan la actividad antitumoral del fruto de *Citrullus colocynthis*, sin embargo, no hay estudios concluyentes a partir de las semillas de dicha especie.

Así, hasta el momento, en la bibliografía existente, aparecen estudios sobre la composición y los posibles efectos terapéuticos de extractos obtenidos de las plantas, o partes de plantas, de la tuerca, obtenidos con el uso de disolventes orgánicos 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 su toxicidad. Por otro lado, tanto su uso tradicional como los estudios realizados avalan el potencial terapéutico de *Citrullus colocynthis* para el tratamiento de diversas alteraciones y enfermedades en animales y seres humanos. En el caso del cáncer en particular, existen numerosos estudios que apoyan la actividad antitumoral del fruto de *Citrullus colocynthis* pero, sin embargo, no hay estudios concluyentes a partir de las semillas de dicha especie.

25 Dado que las terapias actuales contra el cáncer dan lugar a efectos secundarios importantes, existe la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas alternativas frente al cáncer en general, y contra cánceres de alta prevalencia entre la población como el cáncer de colon en particular. Aunque los productos y extractos de plantas están suponiendo un foco de interés en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, para el uso en seres humanos y animales de extractos de plantas sería conveniente que los mismos se hubieran obtenido con disolventes que no conlleven una alta toxicidad potencial pero que, al mismo tiempo, dieran lugar a extractos con un alto contenido en compuestos con un efecto positivo respecto a la actividad terapéutica buscada, preferiblemente con actividad antitumoral selectiva y, a ser posible, que pudieran aplicarse conociendo en profundidad los mecanismos moleculares y celulares implicados en la actividad antitumoral. Además, sería conveniente que dichos extractos se pudieran obtener mediante un procedimiento corto, que

no requiera temperaturas muy elevadas, para facilitar su obtención y no encarecer los costes de producción, facilitando con ello su posible uso clínico.

La presente invención aporta una solución a ese problema.

5

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 *Citrullus colocynthis*, que comprende
10 las etapas de:

- 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.

15 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 μm y 150 μm ;
- b) la harina obtenida en la etapa a) se extrae con la solución hidroalcohólica de extracción en las siguientes condiciones de operación:
20
 - i. temperatura igual a 4 °C,
 - ii. en atmósfera reductora de nitrógeno,
 - iii. la solución de extracción se compone de etanol, agua bidestilada y ácido clorhídrico (12N) en proporciones 50 : 50 : 0,2 en volumen,
 - 25 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.

30

En otra realización preferida, 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:

- i) el precipitado resultante de centrifugar la mezcla de la harina y la solución de
35 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,
- iii) la suspensión se somete a centrifugación, recogiendo el sobrenadante, y
- iv) el extracto etanólico resulta de mezclar el sobrenadante obtenido en iii) con el primer sobrenadante obtenido.

El procedimiento de la invención puede contener una etapa final adicional en la que se evapora parcial o totalmente el etanol del extracto etanólico obtenido.

- En otro aspecto, la invención se refiere a un extracto etanólico de semillas maduras de *Citrullus colocynthis* con elevado contenido fenólico. Dicho extracto será un extracto obtenible por el método de la presente invención.

El extracto etanólico presenta un contenido fenólico totales que oscila entre 7,83 y 10,52 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto. El contenido fenólico total puede ser exactamente 7,83 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto o 10,52 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto.

En otra posible realización, compatible con las anteriores, el extracto etanólico comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo de citrifolinina b epímero b, quercitrina, sophoricoside y tectoridina o combinaciones de los mismos, preferiblemente al menos dos compuestos fenólicos seleccionados del grupo de citrifolinina b epímero b, quercitrina, sophoricoside y tectoridina, siendo posibles combinaciones para la definición del extracto la presencia en el mismo de estos compuestos, particularmente el extracto que comprende la combinación de los cuatro compuestos. El extracto puede comprender al menos un compuesto adicional seleccionado del grupo de cucurbitacina A y withalongolide H.

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, es decir, el extracto donde

- i. el contenido fenólico total es al menos 7,83 equivalentes de ácido gálico/mg extracto,
- ii. el extracto comprende al menos los compuestos citrifolinina b epímero b, quercitrina, sophoricoside y tectoridina

En cualquiera de las definiciones, se prefiere que el extracto se haya obtenido por el 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 prefieren, de nuevo, 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 extracto inicial. En conexión con lo anterior, se tiene preferencia por los extractos con las características de los extractos utilizados en los ensayos de los Ejemplos de la presente solicitud, es decir, extractos obtenidos por las realizaciones del método de la invención que y incluyen la segunda extracción sobre el primer precipitado obtenido y la evaporación final, total o parcial, del etanol y que, además de comprender al menos los compuestos citrifolinina b epimero b, quercitrina, sophoricoside y tectoridina, comprenden también al menos cucurbitacina A o withalongolide H, con especial preferencia con los que contienen cucurbitacina A, por corresponderse con el extracto con el que se han realizado todos los ensayos de los Ejemplos y que da buenos resultados en los ensayos con las líneas de adenocarcinoma de colon y los mejores resultados con casi todas las líneas celulares de glioblastoma multiforme, incluidas las de glioblastoma resistente a quimioterapia, pero también es una realización preferida la de los extractos que también contienen withalongolide H, que también dan buenos resultados con líneas celulares de glioblastoma en incluso mejores que los extractos con cucurbitacina en los ensayos con líneas adenocarcinoma de colon.

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 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 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

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.

5 También son aspectos de la invención un extracto de la presente invención, o una 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
10 aspectos de la invención, tanto el referido al extracto como a la composición farmacéutica, se prefieren los extractos de semillas maduras y las composiciones farmacéuticas preparadas a partir de los mismos. Se tiene especialmente preferencia, particularmente cuando se ha partido de semillas maduras para obtener el extracto y/o la formulación farmacéutica, por el tratamiento del adenocarcinoma de colon, muy especialmente si es
15 resistente a quimioterapia, pero también por el tratamiento del glioblastoma multiforme, en particular si es resistente a quimioterapia.

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
20 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 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
25 cualquier mamífero, con preferencia por un ser humano. Las preferencias en cuanto al uso de un extracto de la invención o de una composición farmacéutica de la invención son también las expresadas respecto al extracto y la composición farmacéutica en sí.

Descripción de los dibujos

30

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

La figura 2.- Muestra una gráfica de la cromatografía de los extractos etanólicos a partir de
35 semilla madura de a) S4101 y b) S4102.

La figura 3.- 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 IC₅₀ del extracto etanólico a partir de harina de semilla madura desengrasada de *Citrullus colocynthis* S4101, así como en células control (células de la línea tumoral de colon T84 sin tratamiento)

La figura 4.- 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 de *Citrullus colocynthis* S4101.

La figura 5.- Muestra una representación de las fases del ciclo celular en las líneas celulares T84, HCT15 y CCD18 cuando son tratadas con extracto etanólico de semilla madura de *Citrullus colocynthis* S4101 a diferentes dosis.

La figura 6.- Muestra imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia del efecto que tiene el extracto etanólico de harina desengrasada de *Citrullus colocynthis* S4101 sobre la polimerización/despolimerización de los microtúbulos en las células T84, empleando inmunofluorescencia con el anticuerpo para α -tubulina.

La figura 7.- Muestra imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de las células T84 tratadas con extracto etanólico de harina desengrasada de *Citrullus colocynthis* S4101 en la que se observan la formación de vesículas autofágicas empleando el ensayo de LysotrackerTM (sonda altamente selectiva para orgánulos ácidos que consiste en un fluoróforo vinculado a una base débil).

La figura 8.- Muestra imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de la formación de vasos sanguíneos por las células HUVEC en presencia de varios medios condicionados.

La figura 9.- Muestra la representación gráfica de los segmentos, tamaño de los segmentos, nodos formados, uniones y mallas (meses) formados durante la angiogénesis por parte de las células HUVEC tras la exposición de las mismas a diferentes medios condicionados.

La figura 10.- Muestra la representación de los valores relativos de expresión de siete marcadores celulares de células madre tumorales (CD133, CD24, CD44, SOC2, OCT4 y NANOG) cuantificados mediante qPCR.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la obtención y en un análisis profundo de un extracto etanólico de una especie vegetal del género *Citrullus* (familia *Cucurbitaceae*), más concretamente, de un extracto hidroalcohólico, obtenido en atmósfera de nitrógeno, de harina de la semilla madura de *Citrullus colocynthis*, conocida comúnmente como tuera, que es una planta que tradicionalmente se ha utilizado ya con distintos fines terapéuticos. De aquí en adelante, se hará referencia a dicho extracto, obtenido por el método de la presente invención, como el extracto etanólico funcional, el extracto etanólico de la (presente) invención o el extracto etanólico funcional de la (presente) invención.

Como se discute en la sección de “Antecedentes de la invención”, son escasos, y poco concluyentes, los estudios a partir de extractos de semilla de *Citrullus colocynthis* relativos a una posible capacidad antitumoral de los mismos, y más concretamente, frente al cáncer de colon. Sí existían, en cambio, estudios realizados con extractos de otras partes de la planta, principalmente el fruto, en los que los extractos, en su mayoría, han sido obtenidos con el uso de disolventes orgánicos altamente tóxicos y/o mediante procesos de extracción de gran complejidad y duración, tras lo que se obtienen una variedad de componentes (tales como flavonoides, cumarinas y terpenoides), algunos de los cuales podrían aumentar su toxicidad, haciendo dudosas las posibilidades de uso terapéutico en seres humanos y animales con suficientes garantías de seguridad y minimizando el riesgo de efectos secundarios negativos. En respuesta a los posibles inconvenientes presentados por los extractos obtenidos a partir de distintas partes de la planta de *Citrullus colocynthis* descritos en el estado de la técnica, obtenidos con disolventes tóxicos que dificultaban su aplicación *in vivo*, se ha desarrollado un extracto obtenido de semillas maduras 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 rendimientos de extracción adecuados. El solvente empleado (etanol) se emplea de forma habitual y a bajas concentraciones para la administración de principios activos, por lo que el método descrito en esta patente representa una ventaja en la posible aplicación a pacientes del extracto obtenido, o de composiciones basadas en el mismo. Este nuevo extracto presenta además una composición más específica de sustancias activas y de baja toxicidad como son los compuestos fenólicos de *Citrullus colocynthis*. Estos compuestos bioactivos se preservan correctamente en el tiempo debido a la presencia de un ambiente reductor, mediante la adición de nitrógeno durante el proceso de extracción, proceso detallado en la presente memoria de patente.

Ninguna publicación previa describía un procedimiento de extracción en frío, en ambiente reductor, de harina de semillas maduras de *Citrullus colocynthis*, con una solución hidroalcohólica. Tampoco se ha descrito ningún extracto que presente en su composición la combinación de compuestos bioactivos identificados en el extracto obtenido (citrifolinina b epímero b, quercitrina, sophorisiside, tectoridina, cucurbitacina A y withangolide H). Y, aunque la utilización como anticancerígenos de extractos de partes de plantas (principalmente frutos) de *Citrullus colocynthis* es conocida en la técnica anterior, ni los datos sobre extractos de semillas eran concluyentes, ni se habían realizado ensayos con extractos como el de la presente invención, con la composición indicada y con especificidad por cáncer de colon y glioblastoma.

Así, la invención expuesta en la presente memoria es pionera en llevar a cabo una extracción etanólica en frío, en medio ácido y en ambiente reductor, a partir de semilla madura de *Citrullus colocynthis* y en demostrar la actividad antitumoral y antiangiogénica contra cáncer colorrectal y glioblastoma que presenta el extracto obtenido, además de caracterizar los compuestos bioactivos que contiene.

La presente invención se basa en:

a) El desarrollo de un extracto etanólico a partir de harina de semilla madura de *Citrullus colocynthis* 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, tras un proceso de extracción etanólica en frío (a temperatura entre 0°C y 8°C, preferiblemente a 4°C) de corta duración (preferiblemente, con un máximo de 1 – 2 horas totales de tiempo de contacto del etanol con la harina y el posible pellet resultante de un primer proceso de extracción), bajo atmósfera reductora de Nitrógeno y en medio ácido, el cual se compone en su gran mayoría de compuestos fenólicos disueltos en un solvente de baja toxicidad.

b) La potente actividad antitumoral de los extractos de semilla de *Citrullus colocynthis* cuando son testados en cultivos celulares de cáncer de colon humanos (T84 de cáncer colorrectal humano metastásico, HCT15 de cáncer colorrectal con mecanismos de resistencia multidrogas (MDR)) utilizando como control una línea epitelial de intestino humano normal (CCD18). 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 demuestran que:

5

1) La metodología empleada para la obtención del extracto etanólico (extracción hidroalcohólica) a partir de la harina procedente de semillas maduras de *Citrullus colocynthis*, da como resultado un producto con alto contenido fenólico. Esto es significativo pues estudios como los de Benariba y colaboradores (Benariba y col., 10 2013) muestran que el solvente utilizado y el procedimiento de extracción influyen no sólo en la concentración de compuestos fenólicos obtenidos de partes de la planta de *Citrullus colocynthis*, sino también en la concentración relativa de los distintos compuestos bioactivos presentes, por lo que no cabía esperar que el procedimiento de la presente invención permitiera obtener extractos con alta concentración de compuestos fenólicos, trabajando con una solución hidroalcohólica (etanol en agua), 15 en frío y en ambiente reductor y durante un tiempo corto, ni eran predecibles las combinaciones de compuestos que podrían encontrarse presentes en el extracto.

20

2) El extracto etanólico de la harina de la semilla madura de distintas variedades de *Citrullus colocynthis* 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 epiteliales de intestino humano normal, por lo que existe un amplio rango terapéutico.

25

3) El efecto antiproliferativo del extracto etanólico procedente de harina de semilla madura de diferentes variedades de *Citrullus colocynthis*, también posee una elevada actividad antitumoral frente a líneas celulares derivadas de glioblastoma multiforme, incluso en líneas resistentes a quimioterapia. Teniendo en cuenta que este es uno de los tumores más agresivos, con mayor resistencia a los citotóxicos de uso habitual en clínica y con menor arsenal terapéutico en la actualidad, esta característica de los extractos de la invención es de gran interés clínico. También se observan efectos antiproliferativos, frente a líneas celulares de cáncer de páncreas, derivadas de adenocarcinoma pancreático, aunque a una concentración inhibitoria del 50% de las 30 células (IC₅₀) más elevada.

35

4) La actividad antitumoral que presenta el extracto etanólico funcional a partir de semilla madura de *Citrullus colocynthis* implica la activación de la ruta de las caspasas, tanto la vía intrínseca como extrínseca, produciéndose muerte celular por apoptosis.

5) El extracto etanólico de la harina de semilla madura de *Citrullus colocynthis* provoca parada en la fase G2/M del ciclo celular en células derivadas de cáncer de colon.

6) La actividad antitumoral que presenta el extracto etanólico funcional a partir de semilla madura de *Citrullus colocynthis* induce en gran medida muerte celular a partir de un trastorno en la polimerización/despolimerización de los microtúbulos celulares. Esto es también una característica de gran interés del extracto etanólico de la invención, pues existe una carencia de agentes terapéuticos contra el cáncer de colon que actúen a este nivel, aunque sí los hay para otros diferentes tipos de tumores (leucemias, linfomas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata...)

7) El extracto etanólico de semillas maduras de *Citrullus colocynthis* impide una correcta comunicación de las células tumorales con las células endoteliales, disminuyendo así el proceso de angiogénesis, y por tanto, la formación de vasos sanguíneos. Es esta también una característica del extracto etanólico de la invención de gran interés para su aplicación contra el cáncer, pues indica que el extracto sería capaz de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos que nutren al tumor y, por tanto, reduciría su crecimiento y su expansión metastásica.

8) El extracto etanólico de semillas maduras de *Citrullus colocynthis* disminuye selectivamente la población de células madre tumorales (CSCs) presente en los cultivos de líneas celulares de cáncer de colon a excepción del marcador CD133. Estas células son responsables de las recidivas del tumor y de los fenómenos de resistencia a los tratamientos. Así, la capacidad de reducir la proporción de CSCs en los cultivos puede tener una gran potencialidad clínica, puesto muchos de los regímenes quimioterápicos actuales no sólo no afectan a CSCs sino que seleccionan esta subpoblación promoviendo la reaparición precoz del tumor y aumentando su agresividad, mientras que el extracto de la invención tendría el efecto contrario.

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 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.

Ejemplos

5

Dado el interés científico que subyace en la especie *Citrullus colocynthis*, en los ensayos expuestos a continuación se han estudiado extractos etanólicos a partir de semillas maduras de dos variedades de esta especie, cedidas por la empresa de fitomejoramiento Agrotec Solutions SL (Almería, España, perteneciente al Grupo Empresarial Cellbitech

10 (www.cellbitech.com). Se han utilizado semillas de las siguientes variedades seleccionadas:

- Variedad S4101, Tuera, (*Citrullus colocynthis*): Esta variedad ha sido mejorada y desarrollada por la empresa cedente siendo su caracterización tipológica de fruto redondo con un peso medio de 150 a 200 gr., piel de rayado intermedio con color verde medio sobre fondo crema; planta trepadora de vigor medio, con tallo piloso y rugoso con desarrollo de zarcillos; hojas son palmeadas lobuladas, alternas y con largos peciolo. Las flores, monoicas y solitarias, son de color amarillo y con pedúnculo, tienen una corola, de cinco pétalos, en forma de campana. La muestra de semilla analizada pertenece al lote producción nº L184101.

20

- Variedad S4102, Tuera, (*Citrullus colocynthis*): Esta variedad ha sido mejorada y desarrollada por la empresa cedente siendo su caracterización tipológica de fruto redondo con un peso medio de 100 a 150 gr., piel moteada con color verde claro sobre fondo crema; planta trepadora de vigor medio, con tallo piloso y rugoso con desarrollo de zarcillos; hojas son palmeadas lobuladas, alternas y con largos peciolo. Las flores, monoicas y solitarias, son de color amarillo y con pedúnculo, tienen una corola, de cinco pétalos, en forma de campana. La muestra de semilla analizada pertenece al lote producción nº L194102.

25

- 30 - 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 de *Citrullus colocynthis*, se esquematiza en la Figura 1 y fue el siguiente:

- 35 1) Moler las semillas maduras obteniendo harina, la cual se conserva a -20°C.

2) Pesar 5 g de la harina obtenida en 1 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 12N).

4) Agitar en un agitador magnético a 300 rpm.

5) Llevar a pH 2 (añadiendo HCl 6N).

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 3000 rpm durante 5' a 4°C.

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.

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.

Siguiendo el protocolo de extracción descrito, se obtuvieron extractos etanólicos de la harina de la semilla madura de *Citrullus colocynthis*.

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 (ThermoScientific) 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.

5

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.

10 La Tabla 1 muestra el rendimiento y contenido fenólico total del extracto a partir de la harina de semilla madura de las variedades de *Citrullus colocynthis* (S4101 y S4102). Como se puede ver en la Tabla, el rendimiento obtenido es mayor en la variedad S4101 (44,64 mg/g harina) frente al rendimiento obtenido en la variedad S4102 (22,95 mg/g harina). Sin embargo, es el extracto etanólico a partir de semilla madura de S4102 la que presenta un
15 mayor contenido fenólico total (10,52 µg equivalente ác. Gálico/mg extracto) en relación con S4101 (7,83 µg equivalente ác. Gálico/mg extracto).

Tabla 1. Valores de rendimiento (mg/g harina) y compuestos fenólicos totales (µg equivalente ác. Gálico/mg extracto) de los extractos etanólicos de diferentes variedades a
20 partir de semilla madura de *Citrullus colocynthis* (S4101 y S4102).

Variedad	Rendimiento (mg/g harina)	Compuestos fenólicos totales (µg equivalente ác. Gálico/mg extracto)
S4101	44,64	7,83
S4102	22,95	10,52

Los estudios cromatográficos realizados han permitido determinar los compuestos presentes en el extracto etanólico de las harinas de semillas maduras de *Citrullus colocynthis*. La
25 técnica utilizada ha consistido en una Cromatografía Líquida de Resolución Ultraelevado (Ultra Performance Liquid Chromatography: UPLC) (ACQUITYH CLASSWATERS) acoplada a un espectrómetro de masas QTOF (SYNAP G2. WATERS). En la Figura 2 pueden observarse las gráficas de la cromatografía de los extractos etanólicos obtenidas a partir de la harina de semilla madura de S4101 y S4102. Las Tablas 2 y 3 incluidas a continuación
30 indican los principales compuestos bioactivos identificados en cada uno de los extractos de

las variedades de *Citrullus colocynthis* y los datos cromatográficos de cada compuesto. Para facilitar la identificación del compuesto, se ha incluido también su número identificar (CID) en la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5 Tabla 2. Compuestos bioactivos del extracto etanólico de harina de semilla madura de *Citrullus colocynthis*, variedad S4101

Nombre	MF	PubChem CID	PPM	TR	[M-H]-	%Conf
Citrifolinina b	C17H22O12	1087341	1,4	2,07	417,1039	99,62
Quercitrina	C21H20O11	5280459	-0,2	3,08	447,0956	99,76
Sophoricoside	C21H20O10	5321398	-0,2	3,53	431,0977	99,14
Tectoridina	C22H22O11	5281810	3,3	3,69	461,1099	99,82
Prodelfinidina B4	C30H26O14	442682	-3,9	4,13	609,122	99,73
Kaempferol-3-O-(6"-O-cis-cumaril)glucósido	C30H26O13	1017530	-2,9	4,54	593,1278	99,88
Procianidina B2	C30H26O12	122738	0	5,02	577,1346	100
Colocintina	C38H54O13	5458429	0,8	6,3	717,3492	99,42
Cucurbitacina A	C32H46O9	5281315	0,2	7,06	573,3065	98,75
Cucurbitacina S	C30H42O6	119287	-1,2	07,06	497,2897	97,77
Galfina A	C34H48O10	637450	1,6	8,75	615,3179	80,83

MF: Fórmula molecular abreviada; PubChem CID: Identificador en la base de datos PubChem; TR: tiempo de retención; MF: fórmula molecular; PPM: error; MS: masa; %Conf: porcentaje de confiabilidad.

Tabla 3. Compuestos bioactivos del extracto etanólico de harina de semilla madura de *Citrullus colocynthis*, variedad S4102

Nombre	MF	PubChem CID	PPM	TR	[M-H]-	%Conf
Citrifolinina b	C17H22O12	1087341	5	2,97	417,1054	99,19
Augustineolide	C38H48O14	21672224	4,3	3,46	727,2997	99,83
Quercitrina	C21H20O11	5280459	-4,9	3,6	447,0905	97,87
Pandaroside G	C40H60O14	44691884	-2,9	3,95	763,3883	97,93
Sophoricoside	C21H20O10	5321398	-2,3	4,51	431,0968	97,75
Tectoridina	C22H22O11	5281810	-6,1	4,65	461,1056	99,86
Glucostreblósido	C37H56O15	199567	1,9	5,35	739,3555	97,98
Glucobovósido A	C37H54O14	2483832	2,9	5,87	721,3456	98,27
Brainicina	C31H28O14	4683223	3,4	6,08	623,1422	98,91
Withalongolide H	C40H58O15	5664930	1,3	7,27	777,3707	96,68
Ajugatakasina A	C34H46O11	45665814	-5,6	8,29	629,2927	97,48
Krishnolide A	C36H46O12		-0,4	10,24	669,2908	96,49
Withalongolide K	C33H46O10	5692627	2,5	10,24	601,3028	99,83
Heterotropatrione	C36H48O12	2172300	-1,5	10,48	671,3058	99,45

- 5 MF: Fórmula molecular abreviada; PubChem CID: Identificador en la base de datos PubChem; TR: tiempo de retención; MF: fórmula molecular; PPM: error; MS: masa; %Conf: porcentaje de confiabilidad.

Aunque cada extracto etanólico presenta compuestos propios, merece destacarse la
 10 presencia de compuestos bioactivos comunes en ambos extractos. Se trata de la citrifolinina

b epímero b (C₁₇H₂₂O₁₂), la quercitrina (C₂₁H₂₀O₁₁), sophoricoside (C₂₁H₂₀O₁₀) y tectoridina (C₂₂H₂₂O₁₁).

Es destacable la presencia de estos compuestos, porque todos ellos han sido previamente
5 aislados de extractos de plantas y se les ha asociado con actividades de interés terapéutico.

La citrifolinina b epímero b ha sido aislada a partir de un extracto metanólico del fruto de *Morinda citrifolia* y presenta actividad antioxidante (Su y col., 2005; Robledo-Pérez y col., 2017).

10

La quercitrina es un compuesto bioactivo que ya se relaciona con su actividad anticancerígena en cáncer de colon. Zhang y col. (2017) aislaron este compuesto a partir de un extracto etanólico (70%) de las hojas de *Toona sinensis* y lo testaron en la línea celular de cáncer de colon SW620. Además de presentar actividad antitumoral, este compuesto
15 detiene las células en fase G₂/M del ciclo celular e induce muerte por apoptosis activando la vía de las caspasas. Otros estudios le atribuyen a la quercitrina actividad antibacteriana y antitumoral en líneas celulares de cáncer de pulmón. Asimismo, también incrementa la actividad de la Caspasa 3 (Cincin y col., 2014).

20 El sophoricoside es un compuesto bioactivo con numerosos efectos farmacológicos, incluidos actuar como un agente antitumoral, antiinflamatorio y antialérgico (Kim y col., 2013).

La tectoridina ha sido aislado de la flor de *Pueraria lobata* y presenta actividad antioxidante
25 actuando como hepatoprotector cuando se induce hígado graso *in vivo* en modelos experimentales animales (Xiong y col., 2010).

Sin embargo, no sólo estos compuestos presentes en ambos extractos son los que tienen bioactividad. Otros compuestos como la cucurbitacina A, presente en el extracto etanólico
30 de semilla madura de la variedad S4101, tiene actividad antitumoral para líneas celulares de cáncer de ovario. Además, produce parada en fase G₂/M del ciclo celular. (Liu y col., 2018).

Otro compuesto con actividad antiproliferativa y que está presente en el extracto etanólico de semilla madura de la variedad S4102 es el withalongolide H. Este compuesto presenta
35 actividad antiproliferativa para las líneas celulares de melanoma, cáncer de mama y cáncer de cuello y cabeza (Zhang y col., 2012).

A la vista de los resultados, se puede concluir que las semillas maduras de la especie *Citrullus colocynthis* contienen compuestos bioactivos con actividad antioxidante y antiproliferativa, lo que apoya la posibilidad de que los extractos obtenidos a partir de las mismas puedan presentar esas actividades, que son favorables para su uso en el tratamiento del cáncer. Dependiendo de la variedad cultivada, la semilla tendrá ciertas variaciones en cuanto a composición, aunque conservará algunos compuestos comunes tales como la quercitrina, la citrifolinina b epímero b, el sophoricoside y la tectoridina. La presencia de otros compuestos presentes sólo en los extractos obtenidos a partir de una de las variedades utilizadas en el ensayo, tales como cucurbitacina A o withalongolide H, puede servir para distinguir extractos obtenidos con una variedad de tuerca de los obtenidos con otra. Así, por ejemplo, los compuestos del grupo de la cucurbitacina A, la cucurbitacina S, galfina A, prodelfinidina B4, Kaempferol-3-O-(6"-O-cis-cumaril)glucósido, procianidina B2 y colocintina se ha detectado sólo en la variedad S4101, mientras que el withalongolide H, withalongolide K, heterotropatrione, augustineolide, pandaroside G, glucostreblósido, glucobovósido A, brainicina, ajugatakasina A y krisholoide A, han aparecido en la variedad S4102; cualquiera de los compuestos presentes en sólo una de las Tablas anteriores 2 y 3, o combinaciones de los mismos, puede servir para el propósito de distinguir los extractos a partir de su composición, especialmente en combinación con la detección de la presencia de los compuestos que parecen ser comunes a ambas variedades, quercitrina, citrofolinina b epímero b, sophoricoside y tectoridina..

Cabe destacar que el conjunto de estos compuestos bioactivos presente en los extractos etanólicos obtenidos son los que les confiere sus propiedades antiproliferativas.

Debido a la escasez de estudios sobre compuestos bioactivos presentes en las semillas maduras de la especie *Citrullus colocynthis* y sobre la posible actividad antitumoral en cáncer de colon, y unido al escaso conocimiento sobre la actividad que pueden presentar los principales compuestos presentes en semillas maduras al actuar de forma combinada (por ejemplo, al estar presentes en un extracto o en una composición preparada a partir de un extracto de semillas maduras) los ensayos que se describen en los siguientes Ejemplos no sólo estudian las propiedades antitumorales que tiene el extracto etanólico de la invención en cáncer de colon, sino que profundizamos en la actuación de estos compuestos y su acción combinada.

- 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, 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 obtenida y cuantificar su concentración (mg/ml), con la cual se calcularon a su vez las diferentes concentraciones a testar. Los cultivos celulares fueron expuestos a concentraciones crecientes del extracto etanólico evaporado de harina de semilla madura de las variedades de *Citrullus colocynthis*, lo que permitió determinar la dosis inhibitoria 50 (IC₅₀) (concentración del extracto a la cual inhibe al 50% de la población celular) mediante la técnica de Sulforodamina B. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Capacidad antitumoral de los extractos a partir de harina de semilla madura, de distintas variedades de *Citrullus colocynthis* (S4101, S4102) *in vitro* a 72 horas en diferentes líneas de cáncer de colon.

Variedades	IC ₅₀ (µg/ml)		
	T84	HCT15	CCD18
S4101	21,58	26,07	121,28
S4102	18,63	24,29	160,53

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. IC₅₀: concentración que inhibe al 50% de las células.

Como puede verse en la Tabla anterior, existe una potente actividad antitumoral frente al cáncer de colon para los extractos etanólicos funcionales a partir de semilla madura de *Citrullus colocynthis* S4101 y S4102. Para el extracto etanólico a partir de semilla madura de *Citrullus colocynthis* S4101, la IC₅₀ en la línea celular T84 fue de 21.58 µg/ml, mientras que para el extracto etanólico de *Citrullus colocynthis* S4102 la IC₅₀ presenta un valor de 18,63 µg/ml. Para la línea celular de cáncer de colon resistente a quimioterapia, HCT-15, también

se obtuvieron valores de IC_{50} bajos tanto para el extracto funcional de *Citrullus colocynthis* S4101 como para el extracto funcional a partir de *Citrullus colocynthis* S4102 (26,07 $\mu\text{g/ml}$ y 24,29 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente). Así, los ensayos realizados con líneas celulares de cáncer de colon tuvieron como resultado valores de IC_{50} casi un orden de magnitud inferiores a los obtenidos con el control, la línea de células sanas.

A la vista de los resultados, podemos concluir que tanto los extractos etanólicos obtenidos a partir de semilla madura de la variedad S4101 como la variedad S4102 son potentes antitumorales frente al cáncer de colon, destacando que el extracto de semilla de la variedad S4102 presenta valores de IC_{50} ligeramente menores para las células tumorales derivadas de cáncer de colon, así como una IC_{50} mayor para la línea celular no tumoral usada como control, presentando, por tanto, un mayor rango terapéutico.

Además, cabe destacar que ambos extractos son selectivos para las células tumorales, ya que cuando son testadas en líneas celulares no tumorales (CCD18) presentan IC_{50} significativamente superiores, con valores de 121,28 $\mu\text{g/ml}$ para el extracto etanólico a partir de semilla madura de S4101 y de 160,53 $\mu\text{g/ml}$ para extracto etanólico a partir de semilla madura de S4102.

Por último, y en base a los resultados prometedores obtenidos en las líneas celulares de cáncer de colon, los extractos etanólicos de semillas maduras de *Citrullus colocynthis* fueron testados en las 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 y LN-229 (líneas celulares humanas de glioblastoma), SF-268 y SK-N-SH (líneas celulares humanas 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.

Tabla 5. Resultados del empleo de extracto etanólico de harina de semilla madura de las variedades de *Citrullus colocynthis*, testado en líneas celulares de glioblastoma multiforme y de adenocarcinoma pancreático.

Variedades	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)				
	SF-268	SK-N-SH	A-172	LN-229	Panc-1
S4101	160,81	34,96	71,07	32,71	236,64
S4102	313,88	36,55	25,28	38,82	277,91

A-172 y LN-229: línea celular humana de glioblastoma; SF-268 y SK-N-SH: líneas celulares humana de glioblastoma resistente a quimioterapia; Panc-1: línea celular humana de adenocarcinoma pancreático.

5 Como puede observarse en la Tabla 5, para el glioblastoma también se observó una potente actividad antitumoral para ambos extractos etanólicos. Tanto el extracto etanólico a partir de semilla madura de S4101 como el extracto etanólico a partir de semilla madura de S4102 presentan valores de IC_{50} similares en las líneas celulares SK-N-SH y LN-229. Sin embargo, se observa que el extracto etanólico a partir de semilla de S4102 presenta mayor poder
10 antiproliferativo para la línea A-172 con un valor de IC_{50} de 25,25 $\mu\text{g/ml}$ frente a 71,07 $\mu\text{g/ml}$ que presenta el extracto etanólico de semilla madura de S4101. Para la línea SF-268 se observa un aumento de la IC_{50} por parte de ambos extractos, siendo menor para el extracto etanólico de semilla de S4101 (16081 $\mu\text{g/ml}$) que para el extracto etanólico de semilla de S4102 (313,88 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 6).

15 Así, puede decirse que ambos extractos funcionales presentan una gran capacidad antitumoral con valores de IC_{50} similares en los ensayos realizados con células de adenocarcinoma de colon, aunque el extracto etanólico de semilla madura de Tuera S4101 presenta valores de IC_{50} inferiores para casi todas las líneas de glioblastoma multiforme. Por
20 esta razón, unida al mayor rendimiento obtenido con las semillas maduras de la variedad S4101, el extracto obtenido de las mismas ha sido seleccionado para llevar a cabo el resto de pruebas moleculares que se detallan en los Ejemplos 3 a 5 presentes a continuación, realizadas con objeto de dilucidar el mecanismo por el que induce muerte celular. En dichos Ejemplos, se aludirá al extracto obtenido de las semillas de la variedad S4101 como “el
25 extracto etanólico de la invención” o “el extracto etanólico de la presente invención”, como caso representativo y posible realización de los extractos de semilla madura de tuera comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

Es de importancia destacar que los extractos de la presente invención no presentan una
30 actividad antitumoral potente frente a todos los tipos de tumores, como es el caso del cáncer de páncreas, en los que los resultados de IC_{50} son más elevados, con valores de 236,64 $\mu\text{g/ml}$ para el extracto etanólico a partir de semilla de S4101 y de 277,91 $\mu\text{g/ml}$ para el extracto etanólico a partir de semilla de S4102.

Esta diferencia de actuación como antitumoral frente a diferentes tipos de tumores es importante, ya que tenemos presente un extracto funcional que no es un citotóxico y no actúa de la misma forma en cualquier línea celular, sino que es selectivo para las células tumorales, y además, dependiendo de las características celulares, presenta mayor o menor efecto antitumoral.

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

10 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 β -actina.

15 Para ello, células de la línea tumoral de colon (T84) fueron cultivadas con una IC_{50} del extracto etanólico obtenido a partir de harina de semilla madura de S4101 y una vez pasadas 72 horas, las células fueron recogidas para proceder a la extracción proteica.

Para llevar a cabo el ensayo de Western Blot, 40 μ g de proteína de las células tratadas con el extracto etanólico, así como de las células control (CCD18), 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 trasferidas 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 [IgGs policlonales de conejo 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 dejó en incubación toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizan dos lavados y se incuba durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario con peroxidasa conjugada. Finalmente, las proteínas son detectadas mediante ECL (*enhanced chemiluminescence*: quimioluminiscencia potenciada) (Bonnus, Amersham, Little Chalfont, UK) (Ortíz y col. 2009).

Una vez realizado el Western Blot (ver Figura 3), se analizaron las bandas obtenidas en los geles, mediante un software analítico específico (Quantity One Bio-Rad), confirmándose que el extracto etanólico de la harina de semilla madura de *Citrullus colocynthis* produce

apoptosis celular mediada por la vía de las caspasas, siendo sobre-expresadas 2,2, 5,3 y 7,0 veces las Caspasas 9, 3 y 8, respectivamente y en relación al control (Figura 4). Estos datos sugieren que el extracto etanólico de la presente invención induce muerte celular por apoptosis, tanto por vía intrínseca como extrínseca.

5

- Ejemplo 4. Estudio del ciclo celular

Para poder conocer en profundidad el mecanismo de actuación del extracto funcional obtenido, se ha llevado a cabo el estudio del ciclo celular en las líneas T84, HCT15 y CCD18
10 para dilucidar si nuestro extracto mantiene a las células en una fase concreta del ciclo celular.

Para ello, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Pasadas 24 horas se trataron con concentraciones del extracto equivalentes a una IC_{25} (10, 20 y 100 $\mu\text{g/mL}$,
15 respectivamente, para las líneas celulares T84, HCT15 y CCD18) y una IC_{50} (20, 30 y 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para las líneas celulares T84, HCT15 y CCD18) de S4101 y se incubaron durante 48 horas. Pasado este tiempo, se tripsinizaron las células, se fijaron con etanol y finalmente se marcaron con Ioduro de Propidio (IP) para posteriormente cuantificar mediante citometría de flujo el contenido total de ADN celular y poder así determinar la fase
20 del ciclo celular predominante, comparándolo siempre con el control que son las células sin tratar.

A la vista de los resultados obtenidos, el extracto etanólico de S4101, en las células tumorales, detiene a las células en fase G2/M, siendo este efecto dosis dependiente, ya que,
25 a mayor concentración, mayor es el número de células que se detienen en esta fase celular (Figura 5). Además, tal y como se describe anteriormente en el estudio cromatográfico, algunos de los compuestos bioactivos que caracterizan los extractos funcionales actúan de forma individual deteniendo las células en la fase G2/M del ciclo celular.

30 - Ejemplo 5.- Estudio de posibles alteraciones en la polimerización/despolimerización de los microtúbulos celulares

Una vez conocido este resultado, el grupo de los inventores llevó a cabo estudios mediante inmunofluorescencia de posibles alteraciones en la polimerización/despolimerización de los
35 microtúbulos celulares. Para ello, cultivos de células T84 fueron expuestos al extracto etanólico (IC_{50}) evaporado a partir de semilla de S4101. Tras 24h, las células fueron fijadas y

e incubadas con un anticuerpo anti-tubulina. Como puede observarse en la Figura 6, la presencia de condensaciones alrededor del núcleo celular indica una alteración de la polimerización/despolimerización de los microtúbulos celulares. Además, a diferencia de los controles, se observa un desordenamiento de los microtúbulos que impiden la división celular, de ahí que se observen gran cantidad de células en división fallida. Algunos agentes quimioterápicos como el Taxol (procedente de la corteza del Tejo) (Yu y col., 2017) y la Vincristina (procedente de la flor de la Vinca) (Xuping y col., 2012) actúan bloqueando la polimerización/despolimerización de la tubulina provocando la muerte de las células tumorales. Estos fármacos se usan en diferentes tipos de tumores (leucemias, linfomas, cáncer de pulmón, de próstata...). Sin embargo, para el cáncer de colon no existen, actualmente, quimioterápicos que actúen a este nivel. Por ello, cabe destacar, la similitud existente en el mecanismo de actuación entre el extracto de la invención obtenido de semillas maduras de tuerca de la variedad S4101 y el taxol.

- Ejemplo 6.- Estudio para determinar el efecto sobre la angiogénesis

La angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales es esencial para el crecimiento de los tumores y para su expansión y la producción de metástasis. En el presente estudio se ha analizado el efecto del extracto etanólico sobre las células tumorales en relación a su comunicación con las células endoteliales y, por tanto, con la formación de neovasos sanguíneos (angiogénesis). Células T84 fueron incubadas con el extracto etanólico a partir de semillas maduras de S4101 a dosis de IC_{25} (10 μ g/mL) e IC_{50} (20 μ g/mL) durante 24h. Tras el lavado de los pocillos (PBS) y la adición de nuevo DMEM (+10%FBS y 1%Ab) libre de extracto etanólico, el cultivo se mantuvo durante 48 horas con el objeto de obtener un medio condicionado. A continuación, células HUVEC (línea celular endotelial del cordón umbilical) fueron sembradas en placas de 96 pocillos con matrigel. Estas células se pusieron en contacto con los medios condicionados previamente obtenidos para observar la formación de vasos sanguíneos.

Como puede observarse en la Figura 7, los medios condicionados procedentes de células T84 en contacto con el extracto etanólico a partir de semillas maduras de S4101, inhibieron la formación de vasos sanguíneos por parte de las células HUVEC en relación al control (células HUVEC sin exposición). La cuantificación de la formación de vasos (número de segmentos, uniones, nodos formados y longitud de los segmentos) demostró una reducción significativa en relación al control (Figura 8). Estos resultados sugieren que el extracto etanólico funcional de la presente invención ejerce un efecto sobre las células tumorales

modificando los factores con los que interactúan con las células epiteliales y provocando una disminución en el proceso de angiogénesis. Este resultado es de enorme importancia puesto que implicaría que nuestro extracto es capaz de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos que nutren al tumor y por tanto, reducir su crecimiento y su expansión metastásica.

- Ejemplo 7.- Estudios sobre la población de células madre tumorales (CSCs) de cáncer de colon

Los tumores se caracterizan por tener subpoblaciones de células tumorales denominadas células madre tumorales (CSCs) que poseen como propiedades fundamentales, el ser indiferenciadas y pluripotentes, pero especialmente por tener una gran capacidad tumorigénica y presentar resistencia a los tratamientos (quimiorresistencia). Estas CSCs son las responsables, en gran medida, de las recidivas en clínica y de la baja efectividad de los tratamientos con regímenes terapéuticos que se usan actualmente. Las CSCs son una población muy heterogénea que identificamos por determinados marcadores celulares, como son CD133, CD44, CD24, NANOG, SOX-2 Y OCT-4 entre otros (Munro y col., 2018).

Para determinar la capacidad antitumoral de nuestro extracto etanólico en ciertas subpoblaciones de células madre tumorales, cultivos de células T84 fueron expuestas al extracto etanólico (IC₅₀) de harina de semillas maduras de Tuera S4101 durante 72h. A partir del ARN extraído de los cultivos, se llevó a cabo una Real Time-qPCR para determinar la expresión de los marcadores de CSCs CD24, CD44, CD133, SOX2, OCT4 y NANOG. Como se observa en la Figura 9, los cultivos tratados con el extracto de semilla de Tuera S4101 mostraron una expresión de los marcadores seleccionados significativamente menor que la obtenida en los controles para todos los marcadores menos para el marcador CD133. Estos resultados sugieren que el extracto etanólico de la presente invención no sólo tiene una actividad antitumoral, sino que es capaz de reducir la proporción de CSCs en los cultivos. Este resultado puede tener una gran potencialidad clínica, puesto que muchos de los regímenes quimioterápicos actuales no sólo no afectan a CSCs, sino que seleccionan esta subpoblación, promoviendo la reaparición precoz del tumor y aumentando su agresividad (Yujuan y col., 2018).

Referencias bibliográficas

- Abdulridha M, Al-Marzoqi A, Ghasemian A. The anticancer efficiency of *Citrullus colocynthis* toward the colorectal cancer therapy. *J Gastrointest Cancer*. 2020; 51(2):439-444
- 5 Amin A, Kucuk O, Khuri F, Shin D. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *J Clin Oncol*. 2009;27(16):2712-2725.
- Amin A, Tahir M, Lone KP. Effect of *Citrullus colocynthis* aqueous seed extract on beta cell
10 regeneration and intra-islet vasculature in alloxan induced diabetic male albino rats. *J Pak Med Assoc*. 2017;67(5):715–721.
- Benariba N, Djaziri R, Zerriouh BH, Bellakhdar W, et al. Short- and long-term effects of various *Citrullus colocynthis* seed extracts in normal and streptozotocin-induced
15 diabetic rats. *International Journal of Molecular Medicine*. 2012;30(6):1528-1536.
- Benariba N, Djaziri R, Bellakhdar W, et al. Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(1):35-40.
- 20 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 EURO CARE-4 study. *Lancet Oncol*. 2007;8(9):773-783.
- 25 Bonta RK. Dietary phenolic acids and flavonoids as potential anti-cancer agents: Current state of art and future perspectives. *Anticancer Agents Med Chem*. 2019 (doi: 10.2174/1871520619666191019112712.)
- Bregni G, Akin Telli T, Camera S, Deleporte A, Moretti L, Bali AM, Liberale G, Holbrechts S,
30 Hendlisz A, Sclafani F. Adjuvant chemotherapy for rectal cancer: Current evidence and recommendations for clinical practice. *Cancer Treat Rev*. 2020 Feb;83:101948.
- Cincin ZB, Unlu M, Kiran B, Bireller ES, Baran Y, Cakmakoglu B. Molecular mechanisms of quercitrin induced apoptosis in non-small cell lung cancer. *Arch Med Res*.
35 2014;45(6):445–454. doi:10.1016/j.arcmed.2014.08.002

- 5 Gaikward M, Shirsat V, Bulbule M, Kalekar S, Munshi R. Ethyl acetate extract of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. fruit suppresses angiogenesis. *J Pharm Pharmacogn Res.* 2019; 7(5):331-342.
- 10 Gupta K, Hegde J.H, Pujari S.J, Kamath J.V, Pre-clinical evaluation of anti-cancer activity of *citrullus colocynthis* linn. Fruit extract. *Int J Pharma Sci.* 2019; 54(2):92-94.
- 15 Huang W, Cai Y, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer.* 2013;62(1):1-20.
- 20 Idrees M, Tejani M. Current treatment strategies for elderly patients with metastatic colon cancer. *Cureus.* 2019 May 22;11(5):e4713.
- 25 Joshi G, Kaur J, Sharma P, Kaur G, Bhandari Y, Kumar R, Singh S. p53-mediated anticancer activity of *citrullus colocynthis*. *Extracts. Nat Prod J.* 2019; 9(4):303-311.
- 30 Kim SJ, Lee GY, Jung JW, et al. The ameliorative effect of sophoricoside on mast cell-mediated allergic inflammation in vivo and in vitro. *Molecules.* 2013;18(5):6113–6127.
- 35 Liu J, Liu X, Ma W, Kou W, Li C, Zhao J. Anticancer activity of cucurbitacin-A in ovarian cancer cell line SKOV3 involves cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of mTOR/PI3K/Akt signaling pathway. *J BUON.* 2018;23(1):124–128.
- 40 Loree J, Kopetz S. Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2017;9(8):551-564.
- 45 Marzouk B, Marzouk Z, Fenina N, Bouraoui A, Aouni M. Anti-inflammatory and analgesic activities of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. immature fruit and seed organic extracts. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(6):665-672.

- Marzouk B, Marzouk Z, Haloui E, Fenina N, Bouraoui A, Aouni M. Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia. *J Ethnopharmacol.* 2010;128(1):15-19.
- 5 Mehta A, Srivastva G, Kachhwaha S, Sharma M, Kothari S. Antimycobacterial activity of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. against drug sensitive and drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and MOTT clinical isolates. *J Ethnopharmacol.* 2013;149(1):195-200.
- 10 Nappi A, Berretta M, Romano C, Tafuto S, Cassata A, Casaretti R, Silvestro L, Divitiis C, Alessandrini L, Fiorica F, Ottaiano A, Nasti G. Metastatic colorectal cancer: Role of target therapies and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets.* 2018;18(5):421-429.
- 15 Nehdi IA, Sbihi H, Tan CP, Al-Resayes SI. Evaluation and characterisation of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad seed oil: Comparison with *Helianthus annuus* (sunflower) seed oil. *Food Chem.* 2013;136(2):348-353.
- Reglero C, Reglero G. Precision nutrition and cancer relapse prevention: A systematic
20 literature review. *Nutrients.* 2019 Nov 16;11(11).
- 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.
- 25 Robledo-Pérez K, Buenaño S. J, Maúrtua M. S, Ramos-Escudero F. Behavior of polyphenol content and antioxidant activity of noni wine (*Morinda citrifolia* L.) during alcoholic fermentation. *Am J Food Technol.* 2017;12(2):144-151.
- 30 Sharma, A., Singh, S., Nag, T. N. Antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* and *Triulsterrestris* against some pathogenic bacteria. *Asian J Microbiol Biotech. Env Sci.* 2010. 12,633–637.
- 35 Su BN, Pawlus AD, Jung HA, Keller WJ, McLaughlin JL, Kinghorn AD. Chemical constituents of the fruits of *Morindacitrifolia* (Noni) and their antioxidant activity. *J Nat Prod.* 2005;68(4):592–595. doi:10.1021/np0495985

Thapliyal A, Krishen R, Chandra A. Overview of cancer and medicinal herbs used for cancer therapy. *Asian J Pharma*. 2018;12(1).

- 5 Wong F, Chai T, Xiao J. The influences of thermal processing on phytochemicals and possible routes to the discovery of new phytochemical conjugates. *Crit Rev Food Sci Nutr*.. 2018;1-6.

10 Xiong Y, Yang Y, Yang J, et al. Tectoridin, an isoflavone glycoside from the flower of *Puerarialobata*, prevents acute ethanol-induced liver steatosis in mice. *Toxicology*. 2010;276(1):64–72. doi:10.1016/j.tox.2010.07.007

15 Zhang H, Samadi AK, Cohen MS, Timmermann BN. Anti-proliferative withanolides from the *Solanaceae*: a structure-activity study. *Pure Appl Chem*. 2012;84(6):1353–1367. doi:10.1351/PAC-CON-11-10-08

20 Zhang Y, Guo Y, Wang M, Dong H, Zhang J, Zhang L. Quercetrin from *Toonasinensis* leaves induces cell cycle arrest and apoptosis via enhancement of oxidative stress in human colorectal cancer SW620 cells. *Oncol Rep*. 2017;38(6):3319–3326. doi:10.3892/or.2017.6042

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de obtención de un extracto vegetal etanólico procedente de harina de semillas maduras de *Citrullus colocynthis*, 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,
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que:
 - 10 a) la semilla se muele hasta obtener harina con un tamaño de partícula de entre 100 μm y 150 μm
 - b) la harina obtenida en la etapa a) se extrae con la solución de extracción en las siguientes condiciones de operación:
 - i. temperatura igual a 4 °C,
 - 15 ii. en atmósfera de nitrógeno,
 - iii. la solución de extracción se compone de etanol, agua bidestilada y ácido clorhídrico (12N) en proporciones 50 : 50 : 0,2 en volumen,
 - iv. pH igual a 2, y
 - v. la mezcla de la harina y la solución de extracción se mantiene en
 - 20 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.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que:
 - 25 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,
 - iii) la suspensión se somete a centrifugación, recogándose el sobrenadante, y
 - 30 iv) el extracto etanólico resulta de mezclar el sobrenadante obtenido en iii) con el primer sobrenadante obtenido.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que incluye una etapa adicional final en la que se evapora parcial o totalmente el etanol del extracto etanólico obtenido.

5. El extracto etanólico obtenible por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. El extracto etanólico según la reivindicación 5, que presenta un contenido fenólico total de al menos 7,83 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto.

7. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, que presenta un contenido fenólico total que oscila entre 7,83 y 10,52 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto.

8. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 7, donde el contenido fenólico total es de 7,83 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto o 10,52 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto.

9. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, que comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo de quercitrina, citrifolinina b epímero b, sophoricoside y tectoridina, o combinaciones de los mismos.

10. El extracto etanólico según la reivindicación 8, que comprende al menos dos compuestos seleccionados del grupo de quercitrina, citrifolinina b epímero b, sophoricoside y tectoridina.

11. El extracto etanólico según la reivindicación 10, que comprende al menos quercitrina y citrifolinina b epímero b.

12. El extracto etanólico según la reivindicación 10, que comprende al menos quercitrina y sophoricoside.

13. El extracto etanólico según la reivindicación 10, que comprende al menos quercitrina y tectoridina.

14. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, que comprende al menos quercitrina, citrifolinina b epímero b, sophoricoside y tectoridina.

15. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, que adicionalmente comprende al menos un compuesto del grupo de cucurbitacina A y

withalongolide H.

16. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, que se ha obtenido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

5

17. El extracto etanólico según la reivindicación 16, en la que se ha llevado a cabo la evaporación final, parcial o total, del etanol según se define en la reivindicación 4.

18. El extracto etanólico según la reivindicación 17, que se ha obtenido por el método de la reivindicación 1, 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 3.

19. El extracto etanólico según la reivindicación 18, que comprende al menos quercitrina, citrifolinina b epímero b, sophoricoside, tectoridina y cucurbitacina A.

20. Una composición farmacéutica que comprende en su formulación un extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 19.

21. La composición farmacéutica según la reivindicación 20, que es una composición farmacéutica combinada que adicionalmente comprende al menos un agente anticancerígeno adicional a los presentes en el extracto.

22. La composición farmacéutica según la reivindicación 20 o 21, que adicionalmente comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

23. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, que incluye en su formulación un extracto de la reivindicación 19.

24. Un extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 19 para su uso en el tratamiento de un tipo de cáncer que se selecciona del grupo de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma.

25. El extracto para su uso según la reivindicación 24, en el que el tipo de cáncer se selecciona del grupo de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pancreático y glioblastoma multiforme.

26. El extracto para su uso según la reivindicación 25 o 22, que es un extracto de semillas maduras de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19.

5 27. El extracto para su uso según la reivindicación 26, para uso en el tratamiento del adenocarcinoma de colon.

28. El extracto para uso según la reivindicación 27, para uso en el tratamiento del adenocarcinoma de colon resistente a quimioterapia.

10 29. El extracto para su uso según la reivindicación 26, para su uso en el tratamiento del glioblastoma multiforme.

15 30. Una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, para uso en el tratamiento de un tipo de cáncer que se selecciona del grupo de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma.

31. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 30, en la que el cáncer se selecciona del grupo de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pancreático y glioblastoma multiforme.

20 32. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 30 o 31, en donde la composición es una composición de la reivindicación 23.

25 33. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 31 o 32, en la que el cáncer es adenocarcinoma de colon resistente a quimioterapia.

34. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 31 o 32, en la que el cáncer es glioblastoma multiforme resistente a quimioterapia.

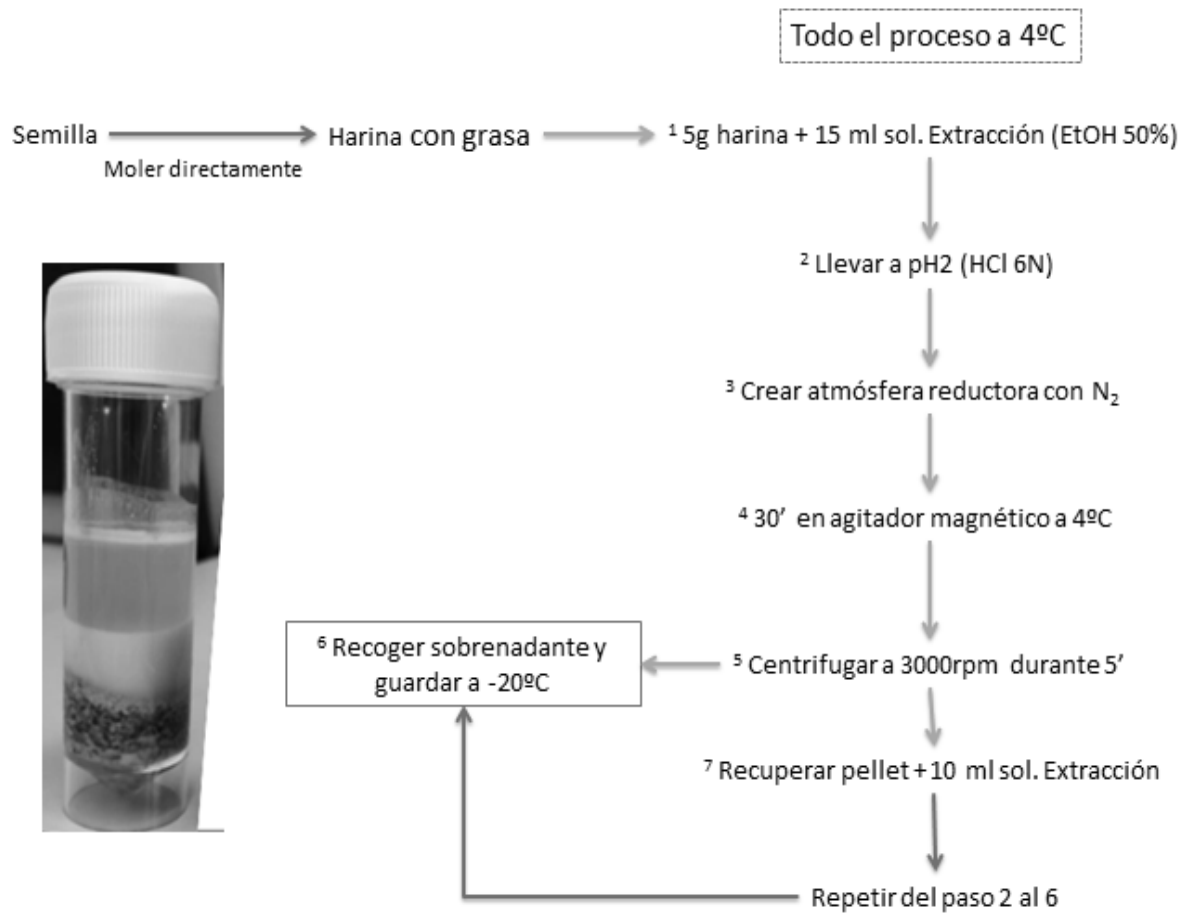
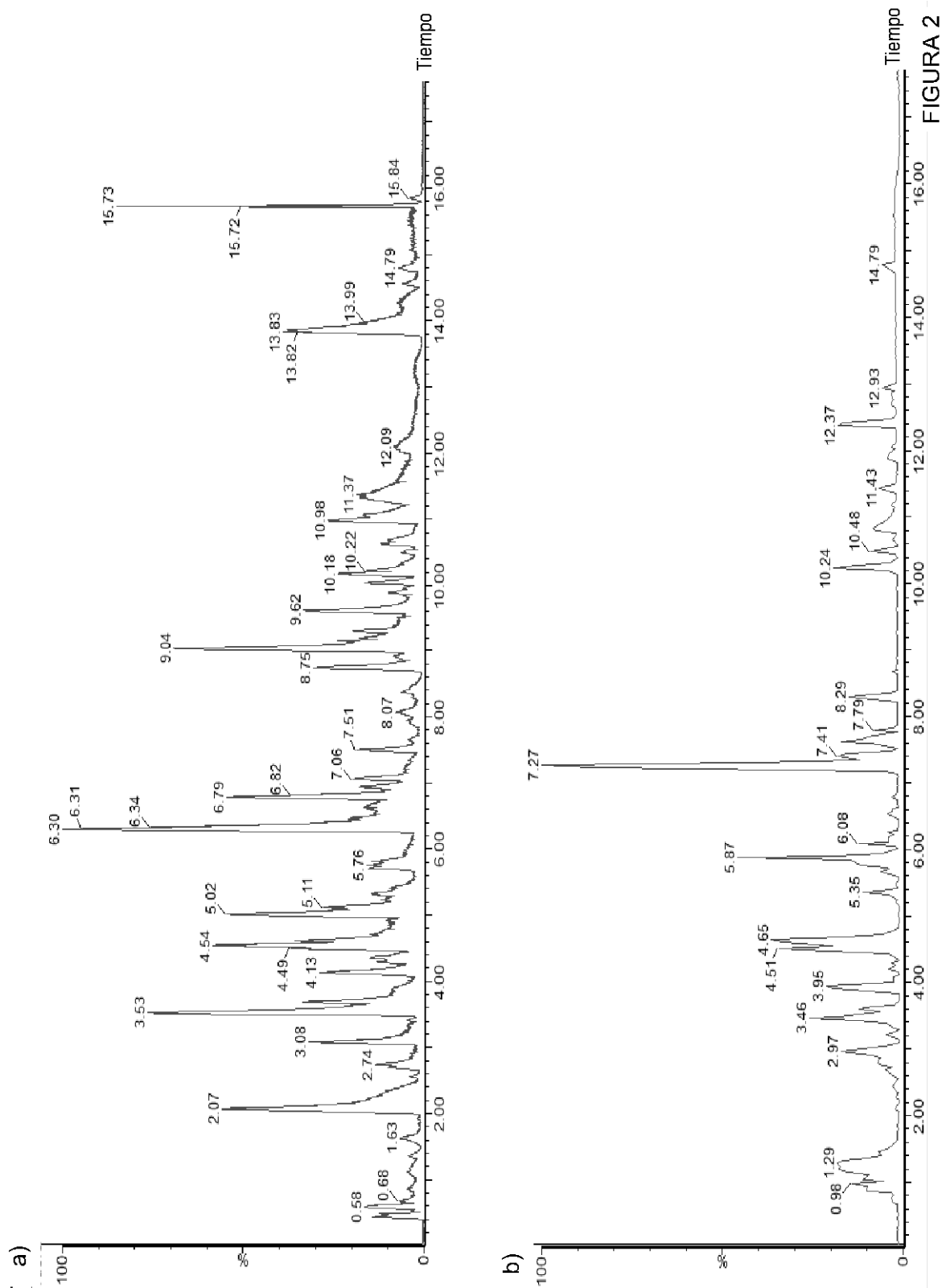


FIGURA 1



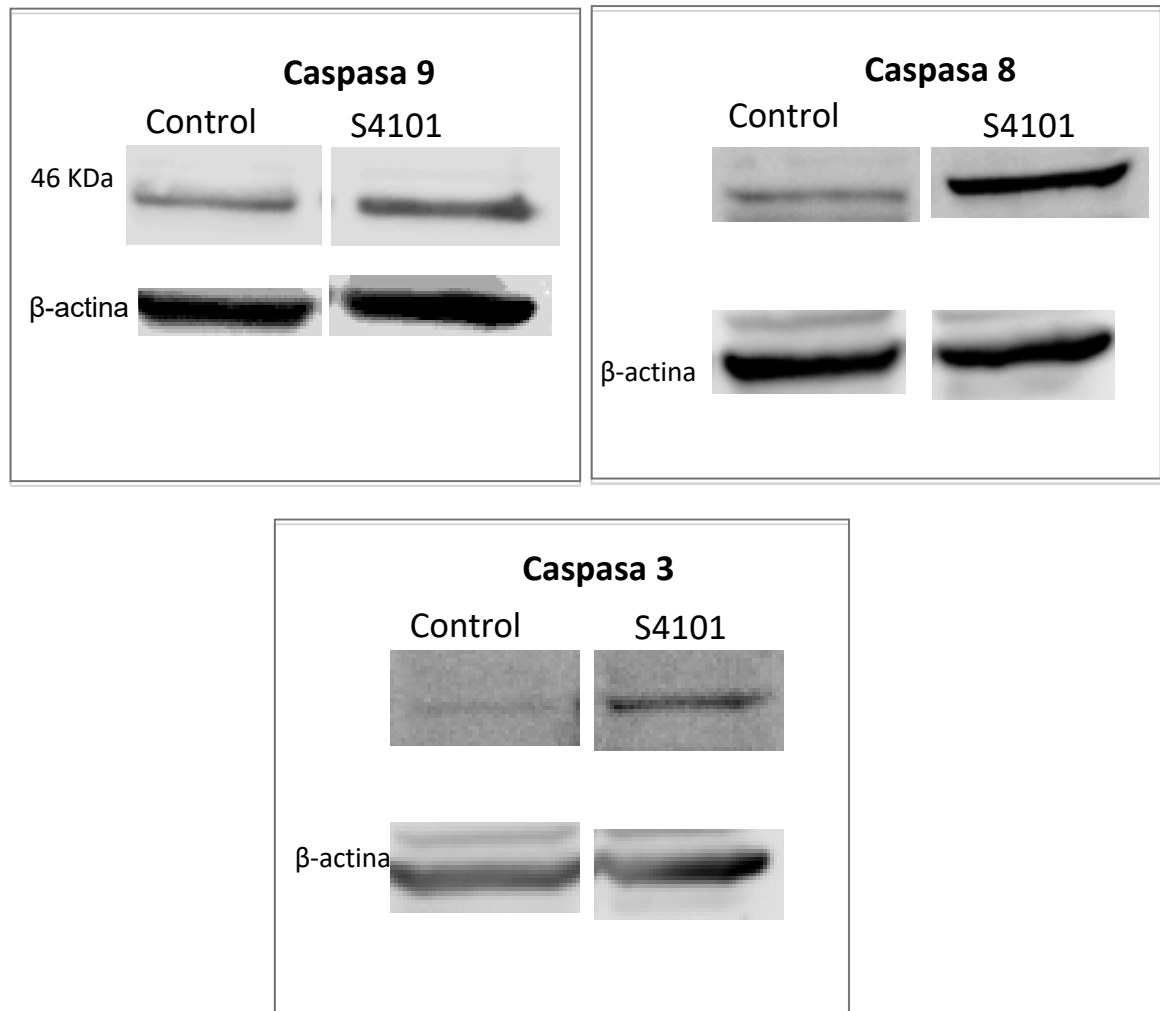


FIGURA 3

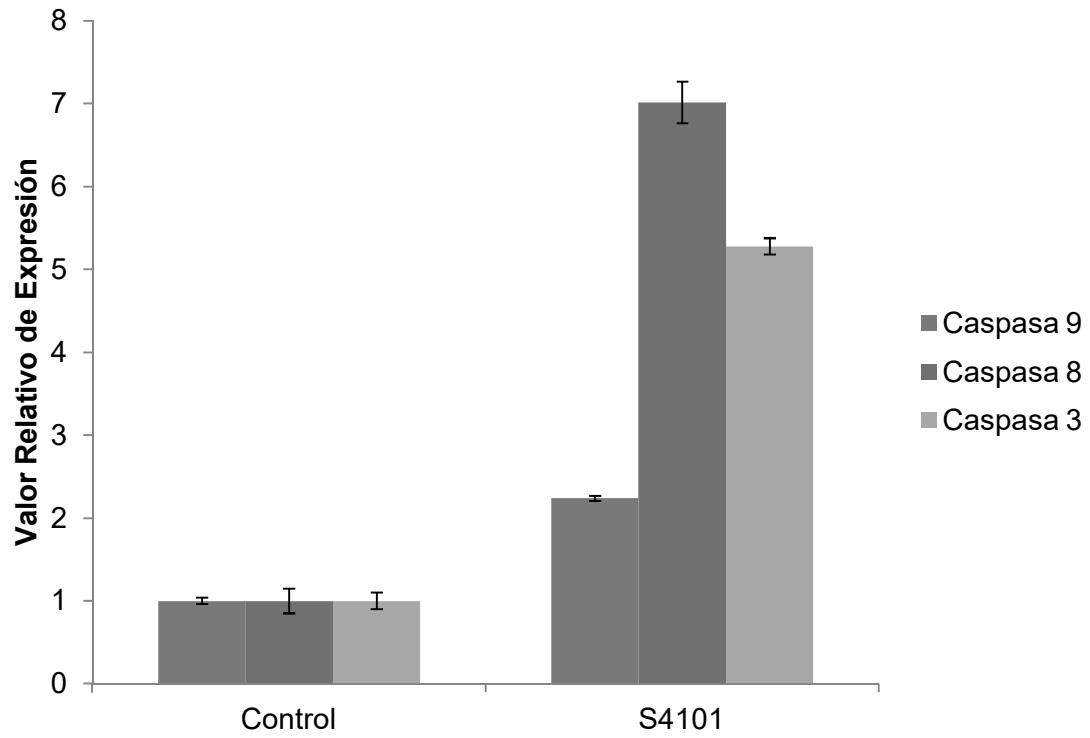


FIGURA 4

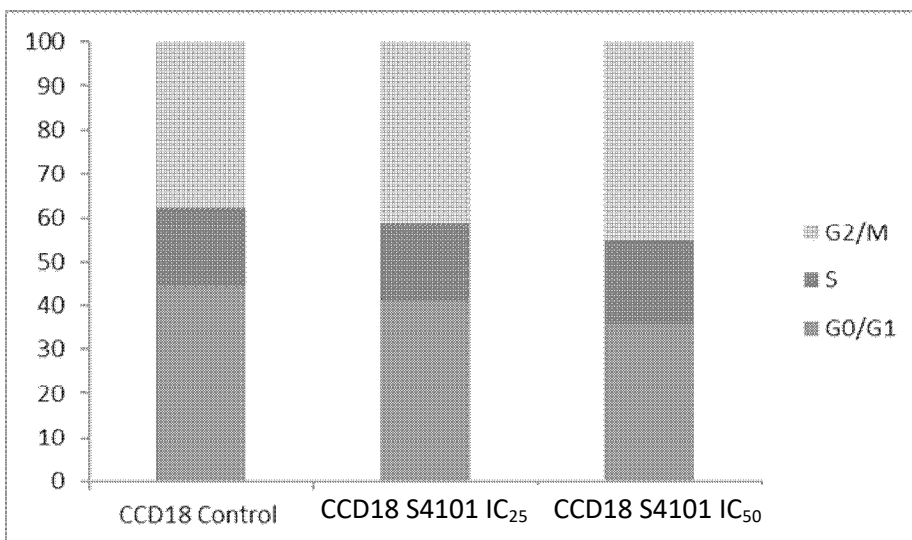
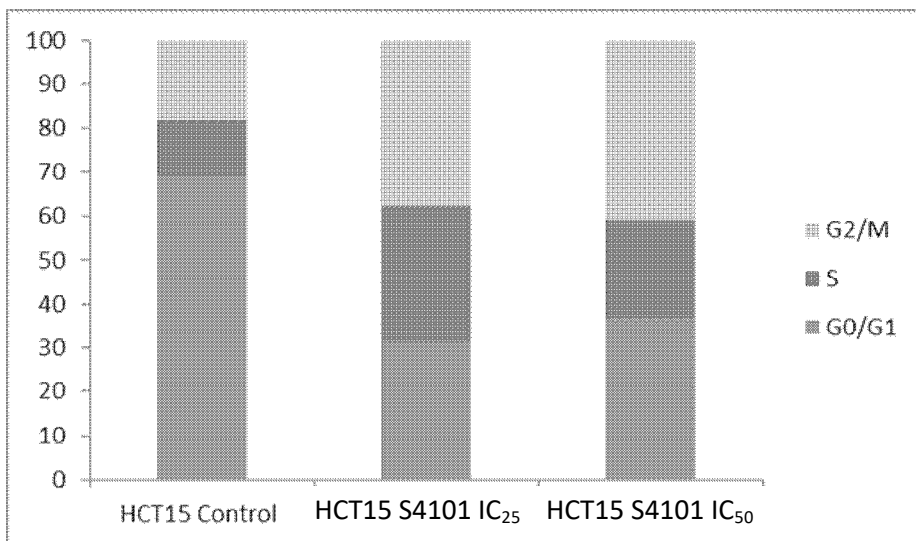
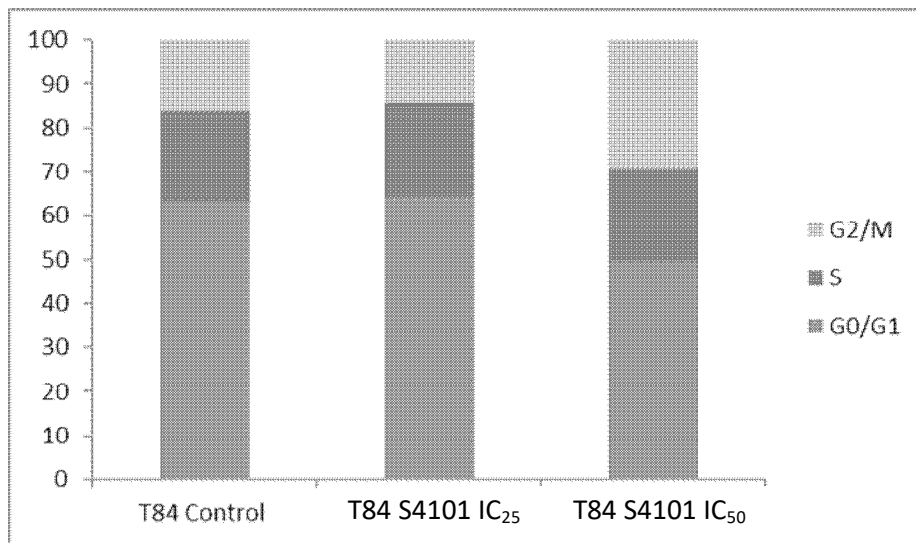
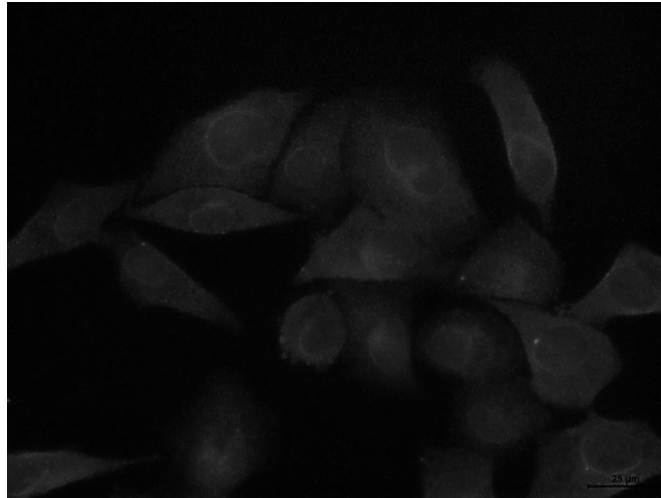
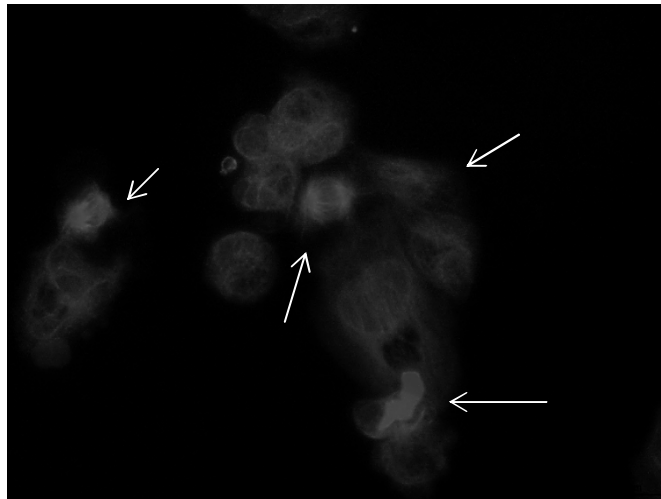


FIGURA 5

CONTROL



S4101 25 µg/ml



S4101 30 µg/ml

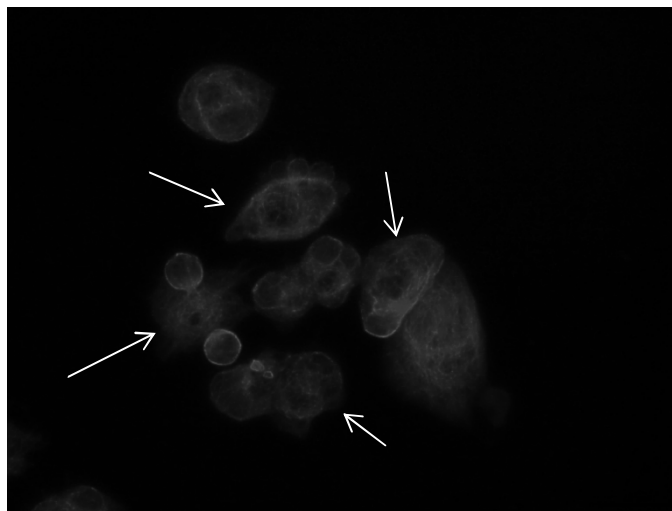


FIGURA 6

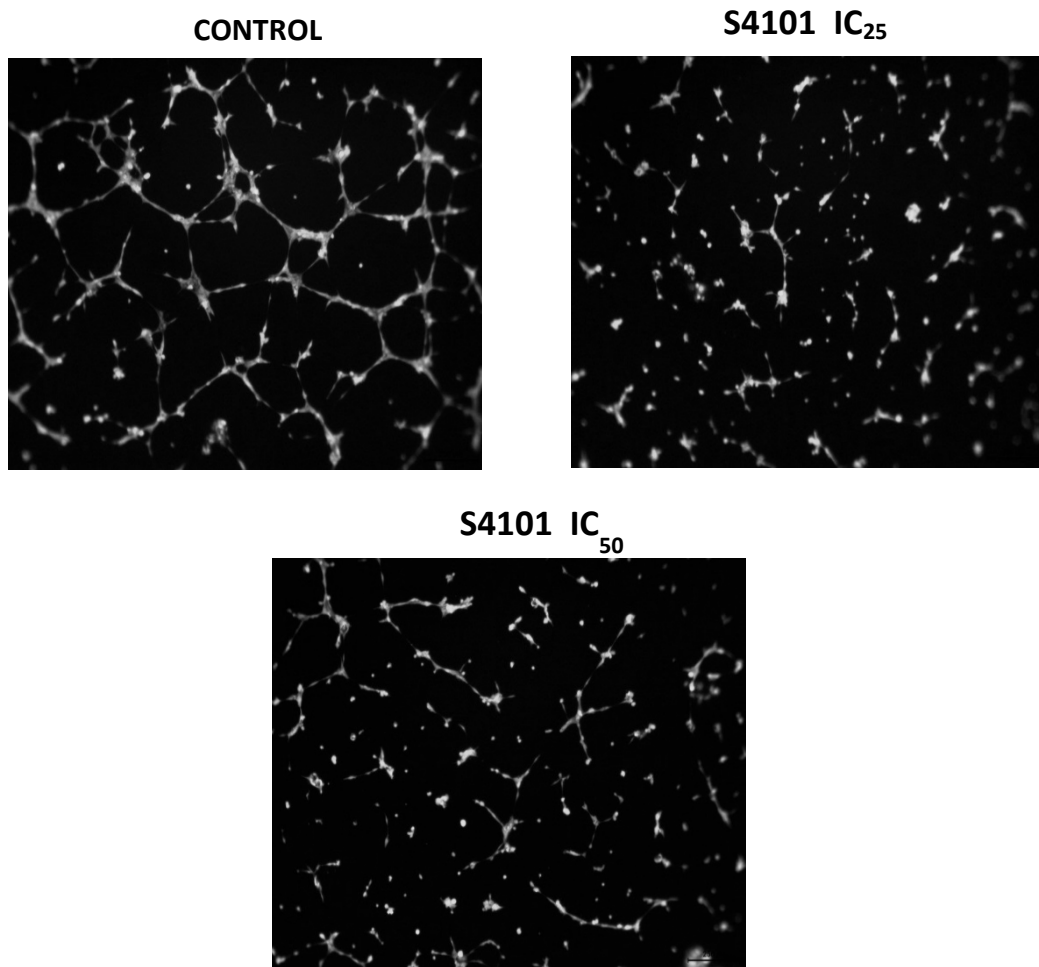


FIGURA 7

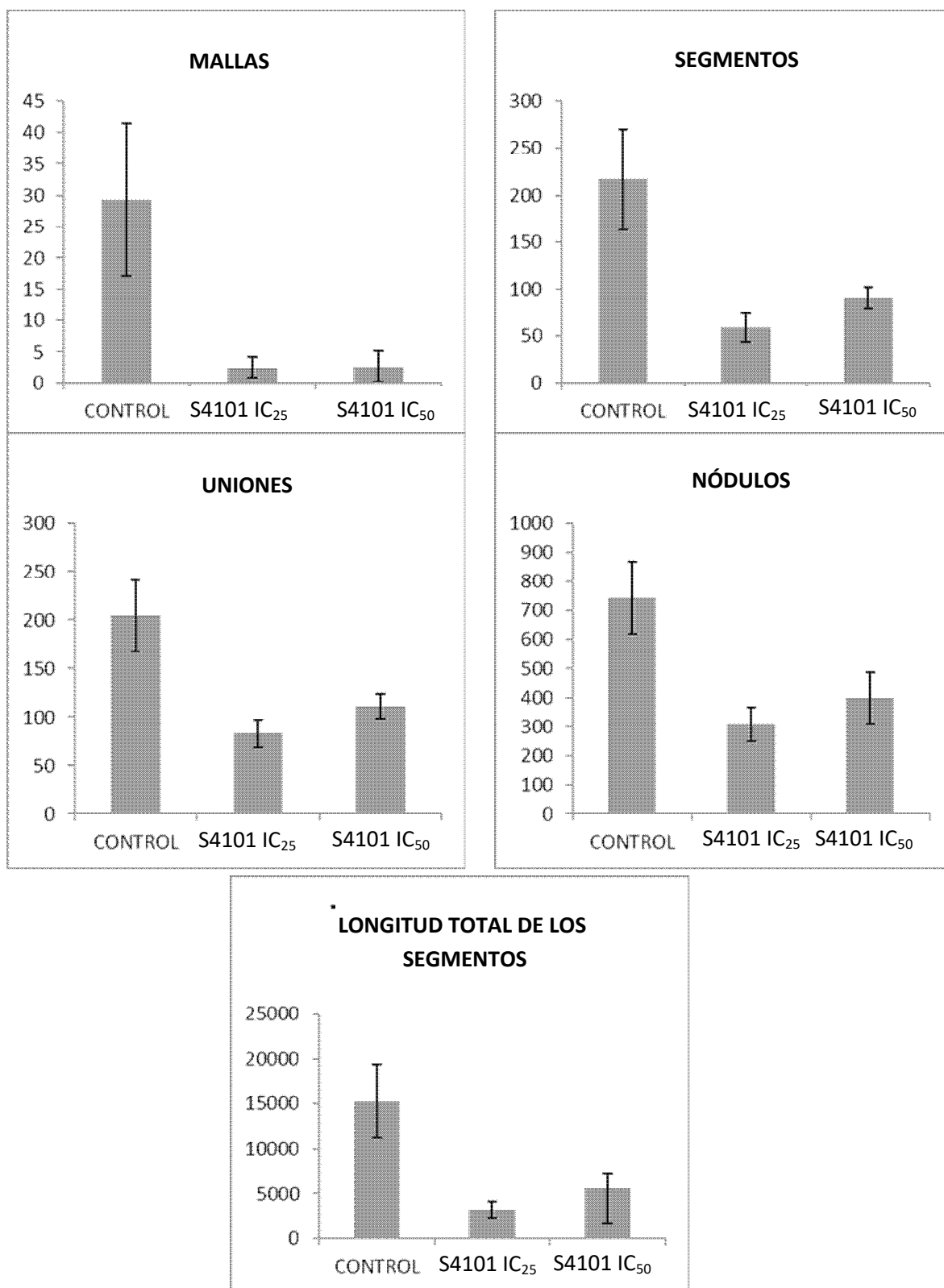


FIGURA 8

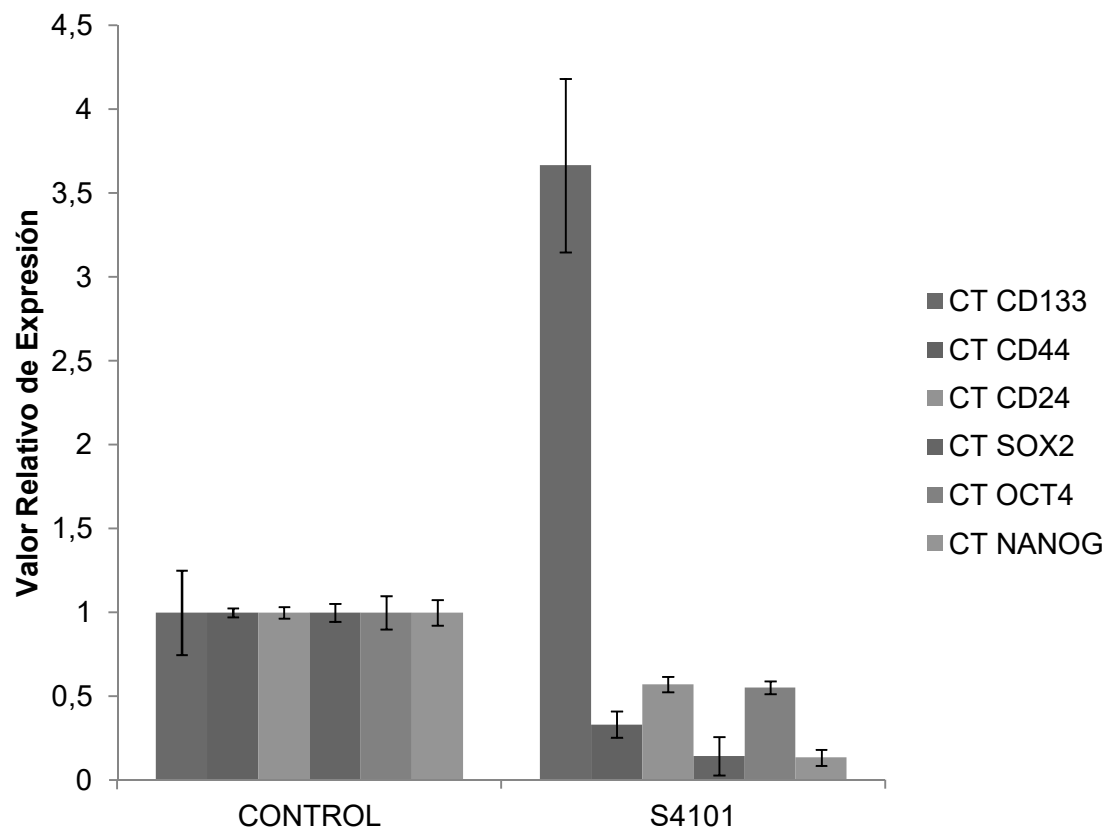


FIGURA 9