

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 117**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2005** **E 05100038 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013** **EP 1571203**

54 Título: **Principios activos antiinflamatorios en el barro termal Euganeo**

30 Prioridad:

09.01.2004 IT MI20040011

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2013

73 Titular/es:

**CENTRO STUDI TERMALI VENETO PIETRO
D'ABANO DI ABANO TERME MONTEGROTTO
TERME (100.0%)
LARGO MARCONI 8
35031 ABANO TERME, IT**

72 Inventor/es:

**LALLI, ALBERTO;
ANDREOLI, CARLO;
CESCHI BERRINI, CRISTINA;
DE APPOLONIA, FRANCESCA y
MARCOLONGO, GABRIELE**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 431 117 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Principios activos antiinflamatorios en el barro termal Euganeo

5 **Campo de la invención**

[0001] El barro termal se ha utilizado desde tiempos ancestrales para el tratamiento de las patologías inflamatorias y en particular para las enfermedades osteoarticulares.

10 [0002] Los complejos termales de Terma Abano, Terma Montegrotto y Terma Battaglia son particularmente famosos por las propiedades terapéuticas de su barro termal y se encuentran al pie de las colinas Euganeas cerca de Padua. El barro se acumula en el fondo de dos lagos termales, (Arqua y Lospida), desde donde se extrae y vierte en depósitos donde experimenta el llamado proceso de "maduración", durante el que se incuba durante 2 meses en presencia de un flujo continuo de agua de manantial a una temperatura de 85-87° C. Durante este proceso el barro se coloniza de forma abundante por cianobacterias y microalgas que transmiten valiosas propiedades físico-químicas y terapéuticas.

20 [0003] Shirahashi H. y col (Chem. Pharm. Bull (Tokyo) Sep 1993; 41 (9): 1664-6) identificaron tres clases de glicolípidos extraídos de la cianobacteria *P. tenue*. Se descubrió que estos glicolípidos, a saber: monogalactosil diacilglicerol (MGDG), digalactosil diacilglicerol (DGDG) y sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG) tenían un efecto promotor antitumoral. Tolomio C. y col., (Cell biochemistry and function, vol. 17, Nº 1, Marzo 1999, páginas 29-33) identificaron diatomeas entre otros microorganismos termófilos como agentes principales de la colonización del barro termal dando como resultado una "maduración" que da lugar a un barro adecuado para usarse en el tratamiento de la osteoartritis. La diatomea produce un sulfoglicolípido que tiene una acción antiinflamatoria.

25 [0004] Gustafson K.R. y col., (JNCI J Natl. Cancer Inst (1989) 81 (16): 1254-1258) analizaron extractos de cianobacterias cultivadas (algas verdeazules) y en particular los glicolípidos que contenían ácido sulfónico, para la inhibición de los efectos citopáticos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1), que está implicado como agente causante del SIDA.

30 [0005] Se ha demostrado recientemente que la eficacia terapéutica del tratamiento con baños de barro no está asociada únicamente a los efectos beneficiosos del calor y los electrolitos sino que es debido a la presencia de sustancias que poseen una alta actividad antiinflamatoria, sintetizadas por microorganismos que colonizan el barro durante el proceso de maduración. Los microorganismos principales presentes en el barro termal Euganeo son cianobacterias y microalgas. Entre éstas, una de las más abundantes es una cianobacteria que pertenece al orden de las Oscillatoriales.

Sumario de la invención

40 [0006] Los presentes inventores han estudiado una de las cianobacterias más abundantes presentes en el barro termal Euganeo y han encontrado sorprendentemente que dicho microorganismo, que pertenece al género *Phormidium* y que se ha denominado ETS-05, es diferente de las cianobacterias conocidas presentes en otros barros termales.

45 [0007] Los inventores también han observado que dicha cianobacteria produce sustancias glicolípídicas que poseen actividades antiinflamatorias mayores que o equivalentes a los antiinflamatorios tradicionales pero que se caracterizan por la ausencia de efectos tóxicos.

50 [0008] Por lo tanto, la presente invención se refiere a los glicolípidos de la cianobacteria ETS-05 con actividad antiinflamatoria y a los medicamentos que comprenden dichos glicolípidos.

[0009] Una primera realización de la presente invención considera el uso de glicolípidos seleccionados entre el grupo que consiste en

- 55 a) monogalactosildiglicéridos que contienen una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados de entre 14 y 18 átomos de carbono caracterizada por que dicha mezcla contiene al menos el 45% de un ácido saturado C16 y al menos el 25% de un ácido tetrainsaturado C18.
- b) digalactosildiglicérido que contiene una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados de entre 14 y 18 átomos de carbono, caracterizada por que dicha mezcla contiene al menos el 45% de un ácido saturado C16 y al menos el 20% de un ácido tetrainsaturado C18, y
- 60 c) una mezcla de (a) y (b).

para la preparación de un medicamento que tiene actividad antiinflamatoria, conteniéndolos dicho medicamento como los principios activos.

65

Descripción de las figuras

[0010]

La Figura 1 es una imagen del microscopio óptico de la cianobacteria ETS-05 que muestra la presencia de tricomas solitarios envueltos por una cubierta delgada, sin heterocistos.

La Figura 2 es una imagen del microscopio óptico de la cianobacteria ETS-05 que muestra la formación de hormogonia (flecha) a continuación de la fragmentación por necridia.

La Figura 3 es una imagen del microscopio electrónico de la cianobacteria ETS-05 que muestra un corte longitudinal de un filamento. Los tilacoides ocupan la mayoría del volumen celular. Es visible la división celular por fisión. El nucleoplasma (flecha) y los carboxisomas (flechas dobles) son visibles.

La Figura 4 es una imagen del microscopio electrónico de la cianobacteria ETS-05 que muestra un corte transversal de la célula. Se pueden ver los Tilacoides (flecha), organizados en líneas desde la periferia hacia el centro de la célula. Se pueden observar algunos carboxisomas (flecha doble) en el centro de la célula.

La Figura 5 muestra el árbol filogenético basado en la secuencia de ADN de los genes que codifican el ARNr 16S. Los números de acceso en el GenBank y los números de orden de las cepas de cianobacterias se indican con comas invertidas.

Las figuras 6A y 6B muestran el espectro de NMR de los glicolípidos extraídos de la cianobacteria ETS-05. Las posiciones marcadas corresponden a las que se muestran en la Figura 7.

La Figura 7 muestra la estructura de los glicolípidos producidos por la cianobacteria ETS-05.

La Figura 8 muestra el efecto antiinflamatorio de los monogalactosildiglicéridos a una concentración del 0,5% (CTS01 0,5), 1% (CTS01 1) y 2% (CTS01 2), en el modelo de edema de la oreja por el aceite de croton, en comparación con el de betametasona 17,21 dipropionato al 0,05% (BETA 0,05). Los resultados se dan como el promedio de cambio en mm del espesor de la oreja en comparación con el valor de base a las 24, 48 y 72 horas.

La Figura 9 muestra el efecto antiinflamatorio de los digalactosildiglicéridos a una concentración del 0,5% (CTS02 0,5), 1% (CTS02 1) y 2% (CTS02 2), en el modelo de edema de la oreja por el aceite de croton, en comparación con el de betametasona 17,21 dipropionato (BETA) al 0,05%. Los datos se dan como el promedio de cambio en mm del espesor de la oreja en comparación con el valor de base a las 24, 48 y 72 horas.

La Figura 10 muestra el efecto preventivo de los monogalactosildiglicéridos a una concentración del 0,5% (CTS01 0,5%), 1% (CTS01 1%) y 2% (CTS01 2%) sobre la necrosis inducida por el aceite de croton en comparación con la de betametasona 17,21 dipropionato al 0,05% (BETA 0,05%). Los datos se expresan como un porcentaje del número de orejas que muestran el fenómeno en cada valor evaluado.

La Figura 11 muestra el efecto antiinflamatorio de los monogalactosildiglicéridos a dosis de 10 mg/kg (CST01 10) y 20 mg/kg (CST01 20) en el modelo de edema agudo de la pata inducido por la carragenina cuando se compara con el de la indometacina a una dosis de 10 mg/kg (INDO 10). Los datos se expresan como el promedio de cambio en el volumen de la pata (en ml) en comparación con el valor de base en diferentes intervalos de tiempo.

La Figura 12 muestra el efecto antiinflamatorio de los digalactosildiglicéridos a dosis de 5 mg/kg (CST02 5), 10 mg/kg (CST02 10) y 20 mg/kg (CST02 20) en el modelo de edema agudo de la pata inducido por la carragenina cuando se compara con el de la indometacina a 20 mg/kg (INDO 10). Los datos se expresan como el promedio de cambio en el volumen de la pata (en ml) en comparación con el valor de base en diferentes intervalos de tiempo.

La Figura 13 muestra el efecto antiinflamatorio de los sulfoquinovosildiglicéridos a la dosis de 10 mg/kg (CST03 10), 20 mg/kg (CST03 20) y 40 mg/kg (CST03 40) en el modelo de edema agudo de la pata inducido por la carragenina en comparación con el de la indometacina a dosis de 10 mg/kg (INDO 10). Los datos se expresan como el promedio de cambio en el volumen de la pata (en ml) en comparación con el valor de base en diferentes intervalos de tiempo.

La Figura 14 muestra el efecto antiinflamatorio de los monogalactosildiglicéridos a una dosis de 5 mg/kg (CST01 5), 10 mg/kg (CST01 10) y 20 mg/kg (CST01 20) en el modelo de edema crónico de la pata inducido por la carragenina en comparación con el de la indometacina a dosis de 0,25 mg/kg (INDO 0,25). Los datos se expresan como el promedio de cambio en el volumen de la pata (en ml) en comparación con el valor de base en diferentes intervalos de tiempo.

La Figura 15 muestra el efecto antiinflamatorio de los sulfoquinovosildiglicéridos a una dosis de 5 mg/kg (GST03 5), 10 mg/kg (GST03 10) y 20 mg/kg (CST03 20) en el modelo de edema crónico de pata inducido por la carragenina en comparación con el de la indometacina a una dosis de 18 mg/kg (INDO 18). Los datos se expresan como el promedio de cambio del volumen de la pata (en ml) en comparación con el valor de base en diferentes intervalos de tiempo.

Descripción detallada de la invención

[0011] La cianobacteria ETS-05 se aísla del barro termal Euganeo, que se obtiene a partir de los lagos termales de Arquá y Lospida, por medio de procesos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo como los que se ilustran en detalle en el ejemplo 1 de la sección experimental.

[0012] Como se demostrará en detalle en el ejemplo 8 y siguientes, la cianobacteria ETS-05 puede producir una mezcla de glicolípidos que tienen una actividad antiinflamatoria mayor que o igual a los antiinflamatorios tradicionales, tales como la indometacina y la betametasona, pero a diferencia de estos no presenta ninguna toxicidad, incluso después de tratamientos repetidos.

[0013] Una primera realización de la presente invención considera el uso de los glicolípidos seleccionados entre el grupo que consiste en

d) monogalactosildiglicéridos que contienen una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados de entre 14 y 18 átomos de carbono caracterizada por que dicha mezcla contiene al menos el 45% de un ácido saturado C₁₆ y al menos el 25% de un ácido tetrainsaturado C₁₈,

e) un digalactosildiglicérido que contiene una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados de entre 14 y 18 átomos de carbono, caracterizada por que dicha mezcla contiene al menos el 45% de un ácido saturado C₁₆ y al menos el 20% de un ácido tetrainsaturado C₁₈, y

f) una mezcla de (a) y (b)

para la preparación de un medicamento que tiene actividad antiinflamatoria, conteniéndolos dicho medicamento como principios activos.

[0014] Preferentemente dichos glicolípidos se usan en una mezcla.

[0015] Las mezclas particularmente preferidas de acuerdo con la presente invención son las siguientes:

a) mezclas que consisten en monogalactosildiglicéridos cuya composición de ácidos grasos se caracteriza por un contenido de ácido saturado C₁₆ de al menos el 45% y un contenido de ácido tetrainsaturado C₁₈ de al menos el 25%, preferentemente mezclas que tienen la siguiente composición de ácidos grasos:

entre el 1,5% y el 2,5% de un ácido saturado C₁₄;
entre el 45% y el 55% de un ácido saturado C₁₆;
entre el 1,5% y el 2,5% de un ácido monoinsaturado C₁₆;
entre el 3% y el 4,5% de un ácido monoinsaturado C₁₈;
entre el 1,5% y el 2,5% de un ácido di-insaturado C₁₈;
entre el 8% y el 9% de un ácido tri-insaturado C₁₈;
entre el 25% y el 35% de un ácido tetrainsaturado C₁₈.

b) Mezclas que consisten en digalactosildiglicéridos cuya composición de ácidos grasos se caracteriza por un contenido de ácido saturado C₁₆ de al menos el 45% y un contenido de ácido graso tetrainsaturado C₁₈ de al menos el 20%, preferentemente las mezclas tendrán la siguiente composición de ácidos grasos:

entre el 0% y el 1% de un ácido saturado C₁₄;
entre el 45% y el 55% de un ácido saturado C₁₆;
entre el 2,5% y el 3,5% de un ácido monoinsaturado C₁₆;
entre el 0% y el 1% de un ácido di-insaturado C₁₆;
entre el 0% y el 1% de un ácido tri-insaturado C₁₆;
entre el 1% y el 2% de un ácido saturado C₁₈;
entre el 1,5% y el 2,5% de un ácido monoinsaturado C₁₈;
entre el 3,5% y el 4,5% de un ácido di-insaturado C₁₈;
entre el 10% y el 12% de un ácido tri-insaturado C₁₈;
entre el 20% y el 30% de un ácido tetrainsaturado C₁₈.

d) Mezclas de las mezclas a) y b) mencionadas anteriormente.

[0016] Los glicolípidos mencionados anteriormente y las mezclas mencionadas anteriormente se pueden obtener a partir de la cianobacteria ETS-05 utilizando un proceso de fermentación y extracción bien conocido por los expertos en la técnica.

[0017] Un aspecto adicional de la presente invención es el uso de los glicolípidos mencionados anteriormente y las mezclas mencionadas anteriormente para la preparación de un medicamento para la terapia de patologías inflamatorias, preferentemente de patologías osteoarticulares. Preferentemente dicho medicamento se utiliza en aplicaciones locorregionales, incluso más preferentemente tópicos.

[0018] La presente invención además se refiere a un medicamento que comprende como principio activo los glicolípidos mencionados anteriormente o las mezclas mencionadas anteriormente en combinación con excipientes y/o diluyentes adecuados. Preferentemente, dicho medicamento tiene una formulación adecuada para su uso locorregional, incluso más preferentemente para su uso tópico.

[0019] Un medicamento para uso tópico que comprende directamente el barro termal Euganeo mezclado con excipientes y diluyentes adecuados es particularmente preferido.

[0020] Los presentes inventores han observado además que el crecimiento de la cianobacteria ETS es óptimo a una temperatura entre 30 y 35° C, preferentemente entre 31 y 33° C y preferentemente en presencia de luz continua ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$).

[0021] El proceso de maduración mencionado anteriormente da lugar a la obtención de un barro termal Euganeo enriquecido con la cianobacteria ETS-05 y que por lo tanto posee una mayor actividad antiinflamatoria que el mismo barro madurado en las condiciones conocidas en la técnica.

[0022] La presente invención se ilustrará con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos:

EJEMPLO 1

Aislamiento y cultivo de cianobacteria ETS-05

[0023] Se recogió una muestra de barro termal de la superficie del depósito de maduración del barro en uno de los establecimientos en el área termal Euganea.

[0024] La muestra se llevó al laboratorio y, después de la observación con un microscopio óptico, se inoculó en un medio de cultivo con diferentes composiciones de nutrientes específicos para el crecimiento de cianobacterias. Después de algunos días la cianobacteria ETS-05 se aisló del medio de cultivo recolectando los filamentos individuales, bajo un microscopio, utilizando una técnica de micropipeta. Los filamentos se inocularon en tubos de ensayo que contenían el medio de cultivo BG11 que se ha observado que es el más adecuado para el crecimiento de *Phormidium*. Después de algunos días se verificó la monoespecificidad de las muestras aisladas.

[0025] Los filamentos individuales de ETS-05 se aislaron con una micropipeta y se cultivaron en matraces de Erlenmeyer, en un medio enriquecido artificialmente, con agitación constante y luz continua ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a una temperatura de 31-33° C durante 24 horas.

[0026] La temperatura de 31-33° C es óptima para el crecimiento de cianobacterias y se seleccionó en un estudio que se emprendió en el intervalo entre 20° y 50° C.

EJEMPLO 2

Caracterización morfológica de la cepa aislada

[0027] Las características morfológicas de la cianobacteria ETS-05 aislada en el ejemplo 1 se evaluaron por examen con microscopio óptico y electrónico.

Materiales y métodos

[0028] Se utilizó un microscopio Leica Dialux 22 equipado con una cámara Wild MPS51 para el análisis con microscopio óptico.

[0029] Para el análisis mediante microscopio electrónico se utilizó un microscopio Hitachi HS9 funcionando a 75 kV.

[0030] Para el análisis mediante microscopio electrónico las células se fijaron con glutaraldehído al 3% en un tampón de cacodilato 0,1 M (pH 6,9) durante 3 horas a 18° C aproximadamente. Después de lavarse en tres cambios de tampón de cacodilato 0,1 M, las muestras de ensayo se fijaron con OsO_4 al 1% durante 2 horas, se deshidrataron en series graduadas de etanol, seguido por óxido de propileno. Las muestras de ensayo se tiñeron entonces con acetato de uranilo mientras se sometían a deshidratación en etanol al 75%. Las muestras de ensayo se embebieron en una mezcla Epon-Durcupan ACM. Cortes delgados, cortados con un Reichert Ultracut S se tiñeron con citrato de plomo y se analizaron.

Resultados

[0031] Como se puede observar en la Figura 1, utilizando el microscopio óptico la cianobacteria ETS-05 muestra tricomas solitarios sin heterocistos. Cuando los tricomas se curvan se pueden observar un movimiento lento similar a ondas de la parte terminal del tricoma y un movimiento axial. La Figura 2 muestra la división celular típica debida a la fragmentación por necridia; esto conduce al desarrollo de hormogonia, siendo estas normalmente cortas y caracterizadas por una envuelta que está abierta en sus extremos y que presenta células terminales redondeadas. Los tricomas totalmente crecidos y desarrollados son isopolares con extremos morfológicamente idénticos, pero

después de la fragmentación los mismos adquieren una polaridad distinta, mostrando células terminales puntiagudas y curvadas en un extremo y células redondeadas en el otro extremo.

[0032] La división celular tiene lugar por fisión a lo largo de un plano perpendicular al eje longitudinal del tricoma.

[0033] Esto es evidente también a partir de las imágenes de microscopio electrónico (Fig. 3) en las que se puede observar la continuidad de los tilacoides aguas arriba de la finalización de la pared celular y la súbita interrupción de los mismos aguas abajo. Las células hijas se dividen y crecen hasta el tamaño de sus células madre antes de la próxima división. Se pueden observar varios tilacoides en cada célula; los mismos ocupan la mayor parte del volumen celular y tienen varios ficobilisomas. Sin embargo, mientras que en un corte longitudinal los tilacoides se disponen en varias filas paralelas concéntricas al nucleoplasma (Fig. 3), en un corte transversal aparecen enrollados irregularmente en el centro y se sitúan perpendiculares a la pared celular hacia la periferia (Fig. 4). Se pueden observar algunos carboxisomas en el centro de las células tanto en la Fig. 3 como en la 4. No se observaron vacuolas de gas.

[0034] La observación con microscopio óptico y electrónico de las células obtenidas a partir del entorno natural de ETS-05 ha demostrado que son idénticas a las cianobacterias cultivadas tanto en sus aspectos morfométricos como en sus características ultraestructurales.

[0035] Las características morfométricas de las células de cianobacteria ETS-05 en cultivo (A) y las obtenidas a partir del entorno natural (B) se resumen en la siguiente tabla 1:

Tabla 1

Morfotipo	A	B
Talo	Tricomas solitarios	Tricomas solitarios
Color de los tricomas	Verde esmeralda	Verde esmeralda
Envuelta	Delgada	Delgada
Longitud celular	$4,6 \pm 0,6 \mu\text{m}$	$5,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$
Anchura celular	$4,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$	$5,0 \pm 0,3 \mu\text{m}$
Formación de la hormogonia	Fragmentación por necridia	Fragmentación por necridia
Motilidad	Movimiento oscilatorio	Movimiento oscilatorio

[0036] Las características morfológicas y ultraestructurales de cianobacteria ETS-05 muestran que probablemente es una especie que pertenece al género *Phormidium*.

[0037] La disposición de los tilacoides corresponde precisamente a la de varias especies del género *Phormidium* y de todos los *Phormidiaceae*. Además, la cepa ETS-05, al igual que las otras especies de *Phormidium*, no posee aerotopos que sí están presentes en *Planktothrix*, *Planktothricoides* y en *Trichodesmium*, es incapaz de fijar el nitrógeno atmosférico a diferencia de las especies que pertenecen al género *Trichodesmium* y *Symploca* y a diferencia de *Porphyrosiphon* y *Pseudophormidium*, no muestra una envuelta rígida ni ramificación falsa, respectivamente. Por último, sus características ultraestructurales y de división celular son diferentes a las observadas en *Tychonema*.

EJEMPLO 3

Análisis filogenético

[0038] Las células cultivadas del ejemplo 1 se recogieron por centrifugación y se extrajo el ADN genómico utilizando el kit DNeasy Tissue de Qiagen. La amplificación y secuenciación del ADN que codifica el ribosoma 16S (ADNr 16S) de la cianobacteria ETS-05 se realizó utilizando los cebadores que se presentan en la tabla 2, que desarrollaron los inventores en base a los alineamientos de secuencias conocidas de ADNr 16S de cianobacterias (*Phormidium ambiguum*, AB003167; *Stanieria cyanosphaera*, AF 132931; *Anabaena cylindrica*, AF091150; *Nodularia* sp., PCC9350; AY038034; *Trichodesmium erythraeum*, AF013030; *Oscillatoria sancta*, AF132933, *Synechococcus elongatus*, D83715), excepto para los cebadores 16S-1 y 16S-2 que fueron designados por Kobayashi (A.N.: D83715).

Cebador	Secuencia	Posición	GenBank
16S-1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEC ID Nº 2)	+1-+20	D83715
16S-2	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (SEC ID Nº 3)	+1453-+1433	D83715
16S-3	5'-CTACGGGAGGCAGCAGTG-3' (SEC ID Nº 4)	+304-+321	AJ548503
16S-4	5'-CACTGCTGCCTCCCGTAG-3' (SEC ID Nº 5)	+321-+304	AJ548503
16S-5	5'-ATACCCAGTAGTCCTAG-3' (SEC ID Nº 6)	+731-+748	AJ548503
16S-6	5'-TAAACCACATACTCCACC-3' (SEC ID Nº 7)	+898-+881	AJ548503

[0039] En detalle, se amplificó el gen de ADNr 16S como un fragmento único a partir del extracto de ADN mediante la técnica de PCR utilizando los cebadores 16S-1 y 16S-2.

[0040] Se utilizó un volumen de reacción de 100 µl que contenía TRIS-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,25 µM de cebadores 3' y 5' y 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Celbio).

[0041] Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes:

2 minutos a 95° C y a continuación 40 ciclos de la siguiente forma:

45 segundos a 95° C,
30 segundos a 58° C y
45 segundos a 72° C

y mediante un ciclo de 10 minutos a 72° C.

[0042] Los productos de la PCR se separaron sobre gel de agarosa al 1%. La banda obtenida se escindió del gel y se extrajo el ADN utilizando el kit Jetsorb Gel Extraction (Celbio). El producto de la PCR se secuenció utilizando el kit ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Core (Applied Biosystems) cubriendo la longitud completa del producto de amplificación en ambas direcciones. Se completó la electroforesis de las reacciones de secuenciación con un secuenciador automático ABI PRISM modelo 377, versión 2.1.1.

[0043] La secuencia identificada corresponde a SEC ID N° 1.

[0044] La secuencia del ADNr 16S se alineó con otras secuencias de cianobacterias disponibles en el GenBank, utilizando el software CLUSTALW.

[0045] En particular, la secuencia se alineó con las secuencias de 27 Oscillatoriales con una longitud de 1100-1500 pares de bases, con las secuencias de algunas especies que pertenecen a los órdenes *Chroococcales* (I), *Pleurocapsales* (II), *Nostrocales* (IV) y *Stigonematales* (V) y con la secuencia de *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* como grupo externo.

[0046] La secuencia de ADNr 16S de la cianobacteria ETS-05 es diferente de las de otras Oscillatoriales termales.

[0047] Se utilizaron dos métodos diferentes para la construcción del árbol filogenético: "vecino más cercano" (NJ) y "máxima parsimonia" (MP).

[0048] Para el método de NJ se utilizó el modo de Kimura de 2 parámetros por el que se eliminaron todas las posiciones de nucleótido que contenían huecos o datos perdidos. Para evaluar la solidez de las ramas en el árbol filogenético se utilizó el "procedimiento de remuestreo Bootstrap (BT)" de Felsenstein con 2000 réplicas.

[0049] El árbol filogenético obtenido, mostrado en la Fig. 5, demuestra que la cianobacteria ETS-05 es una especie que pertenece al género *Phormidium*. En particular, la cianobacteria ETS-05 es un "taxón hermana" del grupo formado por *Planktothricoides raciborskii* y *Phormidium terebiforme*, que son especies termófilas encontradas en muchos manantiales calientes: todos estos taxones pertenecen de hecho al mismo grupo filogenético. Otro taxón termófilo, tal como *Oscillatoria* sp. J-24-Osc forma grupos que están bien separados tanto genética como morfológicamente de los de *Phormidium* sp ETS-05 y *Phormidium terebiforme*.

EJEMPLO 4

Aislamiento y análisis de los glicolípidos producidos por cianobacteria ETS-05

[0050] Se preparó un cultivo de cianobacteria ETS-05 como se describe en el Ejemplo1. Los cultivos se controlaron continuamente pesando las células secas. El material orgánico se recogió entonces por sedimentación y filtración en la fase exponencial tardía - fase estacionaria temprana.

[0051] El material recolectado se secó por congelación. Se produjeron tres lotes diferentes de células liofilizadas para obtener una cantidad de entre 300 y 350 mg de células (en peso seco) por litro de cultivo. Se suspendió 1 g de cada lote del liofilizado obtenido en 25 ml de una mezcla de cloroformo/metanol/agua (en una proporción de 100:50:7). Esta mezcla se trató durante un minuto con un homogeneizador de turbina (Ultraturrax T25, Janke y Kunkel IKA Labortechnik), se agitó posteriormente con un agitador magnético durante 30 minutos y se filtró. El residuo sólido se re-extrajo dos veces con 10 ml de la misma mezcla disolvente y luego se desechó. Los extractos se agruparon, se lavaron con 15 ml de agua y luego el disolvente se evaporó con un rotavapor para conseguir un producto seco.

[0052] Después el residuo se reconstituyó con 20 ml de metanol, 20 ml de n-hexano y 2 ml de agua. La capa inferior se re-extrajo dos veces con 10 ml de n-hexano. Los extractos en n-hexano, que contenían los lípidos neutros y los pigmentos se desecharon, mientras que la solución en metanol/agua, que contenía los lípidos polares, se sometió a evaporación del disolvente con un rotavapor para conseguir un producto seco. El residuo (la fracción lipídica polar) se disolvió en 15 ml de una mezcla 2:1 de cloroformo/metanol; esta solución se utilizó entonces en los análisis cuantitativos posteriores.

[0053] Una fracción lipídica equivalente obtenida por el mismo procedimiento se fraccionó por cromatografía flash en una columna ID de gel de sílice de 250 mm x 25 mm. La elución se llevó a cabo en primer lugar con 400 ml de una mezcla de cloroformo/metanol/agua/ácido acético en una proporción de 90:10:2,5:0,5 y después con 1600 ml de una mezcla de cloroformo/metanol/agua/ácido acético en una proporción de 80:20:2:0,5. Las fracciones eluidas se analizaron por NMR. Las fracciones que contenían moléculas individuales de diacilglicerolípidos puros se agruparon, se evaporaron hasta sequedad con un rotavapor y finalmente se secaron en alto vacío en presencia de P_2O_5 , para remitirse entonces al análisis estructural. Los glicolípidos fueron los componentes principales que se encontraron en los lípidos polares. Todas las etapas anteriores se llevaron a cabo en oscuridad, bajo atmósfera de nitrógeno en frío.

EJEMPLO 5

Análisis de NMR

[0054] Los espectros de NMR de 1H , ^{31}P y ^{13}C de los glicolípidos obtenidos en el ejemplo 4 en una solución de DMSO- d_6 , se obtuvieron por medio de un espectrofotómetro Bruker Avance-600 equipado con una sonda inversa TX-1 de 5 mm que funciona a 600,18; 242,96 y 150,91 MHz respectivamente.

[0055] La asignación de resonancias protónicas se llevó a cabo mediante correlaciones de NMR convencional y mediante experimentos COSY, TOCSY, ROESY y NOESY. Se observó la resonancia protónica del grupo OH y se atribuyó a través de mediciones EXSY bidimensionales, empleadas habitualmente para detectar dinámicas de solución en la región de movimiento lento. Las resonancias de ^{13}C se observaron y se atribuyeron a través de los experimentos COSY heterocorrelacionados (HMBC con secuencia de ave); la cuadratura a lo largo de F1 se consiguió mediante TPPI para átomos de carbono unidos a hidrógeno y por HMBC para átomos de carbono cuaternario.

[0056] Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 6A y 6B, en los que las posiciones indicadas corresponden a las de la Figura 7.

[0057] Los espectros de NMR demuestran que la cianobacteria ETS-05 produce cuatro diacilglicéridos distintos: monogalactosildiglicéridos (MGDG), digalactosildiglicéridos (DGDG), sulfoquinosildiglicéridos (SQDG) y fosfatidilglicerol (PG), mostrados en la Figura 7.

EJEMPLO 6

Análisis cuantitativo

[0058] Se depositaron 0,150 ml de una solución de fracción lipídica polar en una placa TLC con gel de sílice, 20x20 cm, 0,25 mm de espesor, junto con patrones de diacilglicerolípidos individuales. Se utilizó como eluyente una mezcla de cloroformo/metanol/agua/ácido acético (85:15:10:3). La línea de referencia se resaltó con yodo; el gel de sílice que contenía los lípidos individuales se raspó y se extrajo dos veces con 5 ml de una mezcla de cloroformo/metanol 2:1. Los extractos se secaron por evaporación. Los glicolípidos se midieron frente a un patrón de galactosa. El fosfatidilglicerol se midió frente a un patrón de fósforo, después de mineralización con $HClO_4$.

[0059] Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3. Cada valor presentado es la media de tres mediciones.

Compuesto	Lote 1	D.T.	Lote 2	D.T.	Lote 3	D.T.
	Mol %		Mol %		Mol %	
MGDG	50,1	7,07	48,61	2,45	49,39	5,61
DGDG	17,38	4,67	17,05	2,66	16,51	4,25
SQDG	21,90	1,72	23,07	6,23	23,60	1,52
PG	10,71	1,35	11,28	1,20	10,50	0,67

[0060] Como se puede observar en la tabla, el MGDG comprende aproximadamente el 50% de los glicerolípidos, el DGDG está ligeramente por debajo del 20%, el SQDG está ligeramente por encima del 20% y el PG es aproximadamente el 10%.

EJEMPLO 7

Análisis de la composición de ácidos grasos

- 5 **[0061]** Los lípidos se metilaron con trifluoruro de boro-metanol (p/v) al 14%. Los metil ésteres de ácidos grasos se identificaron por comparación con los patrones utilizando cromatografía de gas en columnas capilares.

[0062] Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

Acidos grasos	MGDG Comp. %	DGDG Comp. %	SQDG Comp. %	PG Comp. %
14:0	1,93	0,49	1,17	1,16
16:0	51,94	52,61	76,95	50,52
16:1	1,97	2,83	2,99	2,39
16:2	0,00	0,39	2,01	1,34
16:3	0,00	0,48	0,83	1,06
18:0	0,00	1,23	2,97	3,02
18:1	3,73	1,74	3,32	8,85
18:2	1,82	4,06	3,75	15,14
18:3 n-6	5,26	4,16	0,58	0,48
18:3 n-3	3,18	6,49	3,92	14,58
18:4 n-3	30,17	25,51	1,52	1,48

10 **[0063]** Los principales ácidos grasos contenidos en los cuatro diacilglicéridos son los ácidos C16 y C18 con predominancia del ácido palmítico (16:0). El MGDG y DGDG se caracterizaron por una marcada presencia de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente C18:4.

15 EJEMPLO 8

Evaluación de la actividad antiinflamatoria

20 **[0064]** Se obtuvieron los compuestos MGDG, DGDG y SQDG como se ha descrito en el ejemplo 4. Se prepararon entonces las siguientes soluciones:

Se disolvieron 142 mg de MGDG en 5 ml de etanol absoluto (Carlo Erba) y se llevó a con una solución Tween-80 al 0,5% (Merck) en solución salina fisiológica.

25 Se disolvieron 70 mg de SQDG en 7 ml de DMSO absoluto (Carlo Erba) con la ayuda de un dispositivo de ultrasonidos y se dividió en 10 alícuotas de 700 µl. Cada alícuota se llevó entonces a un volumen de 2 ml con solución salina fisiológica.

Se disolvieron 6 mg de DGDG en 0,179 ml de etanol y se llevó a un volumen de 3 ml con una solución de Tween al 0,5% en solución salina fisiológica.

30 **[0065]** La actividad antiinflamatoria de los compuestos se evaluó utilizando dos modelos experimentales de inflamación *in vivo*:

a) edema de la oreja inducida por aceite de crotón

35 **[0066]** Se utilizó este modelo experimental para evaluar la actividad antiinflamatoria para los compuestos MGDG y DGDG solamente, puesto que el compuesto SQDG no es soluble en etanol. Se utilizaron grupos de 3-5 animales. Se aplicaron 3 µl de la sustancia que se tiene que ensayar en las orejas de cada animal, en concentraciones entre el 0,5% y el 3% en un vehículo volátil (etanol).

40 **[0067]** En paralelo, los animales de control se trataron con 3 µl del vehículo, mientras que los animales tratados con el fármaco de referencia se trataron con 3 µl de una solución etílica al 0,5% de betametasona 17,21 dipropionato (SIGMA).

45 **[0068]** Todos los animales se trataron dos veces al día, a intervalos de 8 horas, durante 5 días. Media hora después del último tratamiento, se aplicaron 5 µl de una solución de aceite de crotón en acetona en las orejas de cada animal.

50 **[0069]** En diferentes momentos después de la aplicación del aceite de crotón, se evaluó la variación del espesor de la oreja en comparación con el valor de base que se mostró inmediatamente antes del último tratamiento utilizando un micrómetro digital (World Precision Instrument). En particular, en la fase preliminar del experimento el espesor de la oreja se midió 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48 y 72 horas después del estímulo inflamatorio; después, habiéndose

establecido que el edema inducido por el aceite de crotón alcanza su pico máximo después de 24 y 48 horas, se consideró suficiente determinar la variación en el espesor de la oreja a las 24, 48 y 72 horas.

[0070] La evaluación estadística de los resultados se llevó a cabo determinando la media aritmética para cada grupo en cada intervalo de tiempo y el error típico relativo. Los resultados se compararon con el ensayo de Dunnet ($p < 0,05$) y con el ensayo t ($p < 0,01$).

[0071] Las figuras 8 y 9 muestran la variación promedio del espesor de la oreja observada con MGDG y DGDG respectivamente a concentraciones del 0,5%, el 1% y el 2%.

[0072] Como se puede observar en la Figura 8, el MGDG a las concentraciones ensayadas demostró una capacidad significativa para reducir el edema, siendo mayor que la observada con el compuesto de referencia betametasona. En particular, 24 horas después del estímulo, el MGDG mostró una reducción del edema del 24% y 22% a las concentraciones del 1% y el 2%, respectivamente, frente a una reducción del 15% observada con la betametasona. Después de 48 horas se observó una clara respuesta dependiente de la concentración: las preparaciones del 1% y el 2% redujeron el edema un 39% y un 53% respectivamente, mientras que la actividad antiinflamatoria permaneció más o menos sin cambios en el caso de la betametasona, en el que la reducción permaneció en el 19%. Después de 72 horas, incluso la concentración más baja de MGDG mostró una actividad estadísticamente significativa en comparación con el control y se observaron reducciones del 39%, el 64% y el 69% respectivamente para las tres concentraciones ensayadas.

[0073] También se ensayó el MGDG a concentraciones más altas (el 3% y el 5%) obteniendo resultados comparables con los observados a la concentración del 2%.

[0074] Para el compuesto DGDG (Figura 9) se observó una reducción dependiente de la dosis, del 7%, el 17% y el 26% respectivamente, 24 horas después del estímulo, demostrando de esta manera una actividad comparable a la de la betametasona a las concentraciones más altas. Después de 48 horas, se observó una reducción del 29% para las concentraciones del 1% y el 2%, siendo ésta mayor que la que se observó con la betametasona (18%).

[0075] A las 72 horas se observó una clara respuesta dependiente de la concentración, con reducciones del 40%, el 49% y el 52% respectivamente.

[0076] En el caso del DGDG no fue posible ensayar concentraciones más altas del compuesto debido a su baja solubilidad.

[0077] Como se muestra en la Figura 10, el experimento *in vivo* ha destacado el hecho de que la necrosis del tejido de la oreja, que representa la progresión natural del fenómeno inducido por el aceite de crotón, es considerablemente menor en los animales tratados con los compuestos que se tienen que ensayar en comparación con los animales de control y, en particular, con los animales tratados con el fármaco de referencia. Dicha reducción es dependiente de la dosis y es mayor cuando se utiliza el compuesto MGDG.

[0078] Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que los compuestos examinados no solo muestran una eficacia antiinflamatoria que es mayor que la de la betametasona, sino que también son capaces de prevenir, de manera dependiente de la dosis, la necrosis tisular que en cambio es promovida por la betametasona.

b) edema de pata inducido por carragenina

[0079] Se utilizaron grupos de 6-8 animales para los experimentos.

[0080] Se indujo el edema en la pata derecha de cada animal mediante la administración subcutánea en la región plantar de 50 μ l de una solución al 1% p/v de carragenina de tipo λ (FLUKA) en solución salina fisiológica.

[0081] En una etapa preliminar del experimento, se administraron por vía subcutánea dosis de 5 a 80 mg/kg de la sustancia que se tiene que ensayar (MGDG, DGDG o SQDG) a los animales, dos veces al día empezando tres días antes de la inducción del edema y hasta 72 horas después (modelo crónico). El edema de la pata se evaluó en diferentes intervalos de tiempo: 2, 24, 48 y 72 horas después del estímulo como las variaciones en comparación con un valor de base, observadas inmediatamente antes de la inyección de carragenina. Los animales de control se trataron con el vehículo respectivo, mientras que a los animales tratados con el fármaco de referencia se les administraron 0,25-18 mg/kg de indometacina disuelta en solución salina fisiológica una hora antes de la inyección de carragenina y hasta 72 horas después, dos veces al día.

[0082] Posteriormente, en la etapa de optimización del modelo, los animales tratados con la sustancia que se tiene que ensayar y con la indometacina recibieron una única administración subcutánea media hora antes de la inducción del edema (modelo agudo). A los animales de control se les inyectó simplemente el vehículo que se utilizó. Se evaluó la variación en el volumen de la pata con respecto a un valor de base en los siguientes intervalos de tiempo: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 24 y 48 horas después del estímulo. La evaluación estadística de los resultados se realizó

determinando la media aritmética para cada grupo en cada intervalo de tiempo y el error típico relativo. Los resultados se compararon con el ensayo de Dunnet ($p<0,05$) y el ensayo t ($p<0,01$). Las Figuras 11, 12 y 13 muestran los resultados obtenidos a partir del análisis de las actividades de MGDG, DGDG y SQDG, de acuerdo con el modelo agudo descrito anteriormente.

[0083] En cuanto al MGDG (Figura 11) se ensayaron dosis de 10, 20, 40 y 80 mg/kg y se observó un pico de actividad a la dosis de 20 mg/kg. Esta dosis mostró mejor actividad que la indometacina utilizada en estos experimentos a una dosis de 10 mg/kg. Para el DGDG (Figura 12) se ensayaron dosis de 5, 10 y 20 mg/kg y se observó una clara actividad dependiente de la dosis. Contrariamente al DGDG, la actividad antiinflamatoria, aunque era estadísticamente significativa entre las 3 y 9 horas después del estímulo inflamatorio, sin embargo era más baja en la dosis ensayada más alta, en comparación con la del fármaco de referencia.

[0084] Con respecto al SQDG (Figura 13) se ensayaron dosis de 10, 20 y 40 mg/kg. Únicamente a la dosis más alta ensayada el compuesto mostró actividad antiinflamatoria comparable a la observada con la indometacina a la dosis de 10 mg/kg.

[0085] Las Figuras 14 y 15 muestran los resultados obtenidos a partir del análisis de actividad de MGDG y SQDG a dosis de 5, 10 y 20 mg/kg de acuerdo con el modelo crónico descrito anteriormente.

[0086] En el caso de MGDG, 2 horas después del estímulo, los porcentajes de reducciones de volumen de la pata en comparación con los de los animales de control fueron, para las dosis ensayadas, del 8%, el 50% y el 81% respectivamente, por lo que únicamente la dosis de 20 mg/kg dio una reducción mayor que la indometacina a 0,25/kg (reducción del 58%). A las 24 horas incluso a la dosis de 10 mg/kg se observó una reducción mayor que la obtenida con el fármaco de referencia (30%, 57% y 58% respectivamente para las tres dosis de MGDG y el 43% para la indometacina). A las 48 y 72 horas todas las dosis ensayadas fueron más activas que la indometacina, con la mayor reducción para la dosis de 20 mg/kg (42% y 48% a las 48 y las 72 horas respectivamente).

[0087] En el caso del SQDG, con excepción de la dosis de 20 mg/kg, que después de 2 horas produjo una reducción del edema del 53%, mayor que la observada con la indometacina a la dosis de 18 mg/kg (47%), no se verificó una actividad mayor ni comparable con la del fármaco de referencia a las 24, las 48 y las 72 horas, para ninguna de las dosis ensayadas.

[0088] Se encontró que la indometacina que se utilizó como fármaco de referencia en los experimentos crónicos era tóxica a la dosis de 18 mg/kg, conduciendo a pérdida de peso corporal y las muertes de la mitad de los animales tratados antes de que terminara el experimento. Esta observación ha producido que se use necesariamente la dosis de 10 mg/kg en los experimentos posteriores. Los compuestos ensayados, por el contrario, no mostraron signos de toxicidad en ninguno de los experimentos realizados incluso cuando se utilizaron en dosis más altas que la indometacina (hasta 80 mg/kg).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0089]

<110> Centra Studi Termali Veneto Pietro D'Abano di Abano Terme Montegrotto Terme

<120> PRINCIPIOS ACTIVOS ANTIINFLAMATORIOS EN EL BARRO TERMAL EUGANEO

<130>4235PTEP

<150> IT MI2004A000011

<151> 09-01-2003

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1414

<212> ADN

<213> Phormidium sp. ETS-05

<400> 1

gatgaacgct ggcgggtctgc ttaacacatg caagtcgaac ggaatccttc gggatttagt	60
ggcggacggg tgagtaacgc gtgagaatct gccttcagga cggggacaac agttggaaac	120
ggctgctaaa acccgatgtg ccgaaagggtg aaaaatttat tgctgaaga tgagctcgcg	180
tccgattagc tagttggcgg ggtaaaggcc caccaaggcg gcgatcggta gctgggtctga	240
gaggatgagc agccacactg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt	300
ggggaatttt ccgcaatggg cgaaagcctg acggagcaag accgcgtggg ggaggaaggc	360
tcttgggttg taaacccctt ttctcaggga agaataatga cggtaacctga ggaatcagcc	420
tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga ggcaagcgtt atccggaatt	480
attgggcgta aagcgtccgc aggtggctag tcaagtcggt ggtcaaagca cagggtcaa	540
ctctgtaaag gccggcgaaa ctgacaggct agagtgcggt aggggcagag ggaattcccg	600
gtgtagcggg gaaatgcgta gatatcggga agaaccacag tagcgaaagc gctctgctgg	660
accgcaactg acactcaggg acgaaagcta ggggagcgaa tgggattaga taccacagta	720
gtcctagccg taaacgatgg atactagggtg ttgtctgcat cgaccggac agtgccggag	780
ctaacgcgtt aagtatcccc cctggggagt acgcacgcaa gtgtgaaact caaaggaatt	840
gacgggggcc cgracaagrg gtggagtatg tggtttaatt cgatgcaacg cgaagaacct	900
taccagggct tgacatgtcg cgaacccgc tgaaagggtg ggggtgccttc gggagcgca	960
acacagggtg tgcatggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccga	1020
acgagcgcaa ccctcgtcct tagttgccat cattaagttg ggcactctag ggagaccgcc	1080
ggtgataaac cggaggaagg tggggacgac gtcaagtcag catgcccctt acgccctggg	1140
ctacacacgt actacaatgg tcaggacaga gggccgcaa ctcgcgagag agagctaatac	1200
ccgaaaacct ggcctcagtt cagattgaag ttgcaactc agcttcatga aggcggaatac	1260
gctagtaatac gcaggtcagc atactgcggt gaatgcgttc ccgggccttg tacacaccgc	1320
ccgtcacacc atggaagttg gccatgccg aagtcattac tctaaccctg atgggaggag	1380
ggtgccgaag gcagggtga tgactgggga ggtg	1414

REIVINDICACIONES

1. Uso de glicolípidos elegidos entre el grupo que consiste en

- 5 a) monogalactosildiglicéridos que contienen una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados de entre 14 y 18 átomos de carbono **caracterizados por que** dicha mezcla contiene al menos el 45% de un ácido saturado C16 y al menos el 25% de un ácido tetrainsaturado C18.
 b) digalactosildiglicérido que contiene una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados de entre 14 y 18 átomos de carbono, **caracterizado por que** dicha mezcla contiene al menos el 45% de un ácido saturado C16
 10 y al menos el 20% de un ácido tetrainsaturado C18, y
 c) una mezcla de (a) y (b).

para la preparación de un medicamento que tenga actividad antiinflamatoria, conteniéndolos dicho medicamento como principios activos.

15 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** las mezclas (a) tienen la siguiente composición de ácidos grasos (a'):

- entre el 1,5% y el 2,5% de un ácido saturado C₁₄;
 20 entre el 45% y el 55% de un ácido saturado C₁₆;
 entre el 1,5% y el 2,5% de un ácido monoinsaturado C₁₆;
 entre el 3% y el 4,5% de un ácido monoinsaturado C₁₈;
 entre el 1,5% y el 2,5% de un ácido di-insaturado C₁₈;
 entre el 8% y el 9% de un ácido tri-insaturado C₁₈;
 25 entre el 25% y el 35% de un ácido tetrainsaturado C₁₈.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** las mezclas (b) tienen la siguiente composición de ácidos grasos (b'):

- entre el 0% y el 1% de un ácido saturado C₁₄;
 30 entre el 45% y el 55% de un ácido saturado C₁₆;
 entre el 2,5% y el 3,5% de un ácido monoinsaturado C₁₆;
 entre el 0% y el 1% de un ácido di-insaturado C₁₆;
 entre el 0% y el 1% de un ácido tri-insaturado C₁₆;
 35 entre el 1% y el 2% de un ácido saturado C₁₈;
 entre el 1,5% y el 2,5% de un ácido monoinsaturado C₁₈.
 entre el 3,5% y el 4,5% de un ácido di-insaturado C₁₈;
 entre el 10% y el 12% de un ácido tri-insaturado C₁₈;
 entre el 20% y el 30% de un ácido tetrainsaturado C₁₈.

40 4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho medicamento que tiene actividad antiinflamatoria se utiliza en el tratamiento de patologías inflamatorias.

45 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dichas patologías inflamatorias son patologías osteoarticulares.

6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho medicamento es adecuado para administración tópica.



Fig. 1

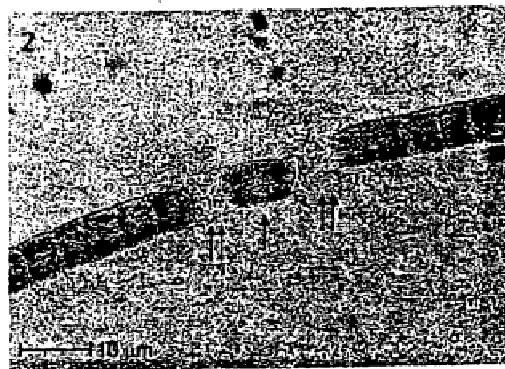


Fig. 2

3

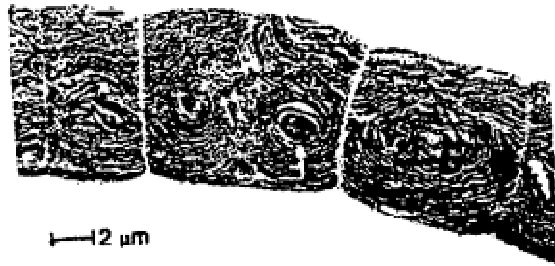


Fig. 3

4

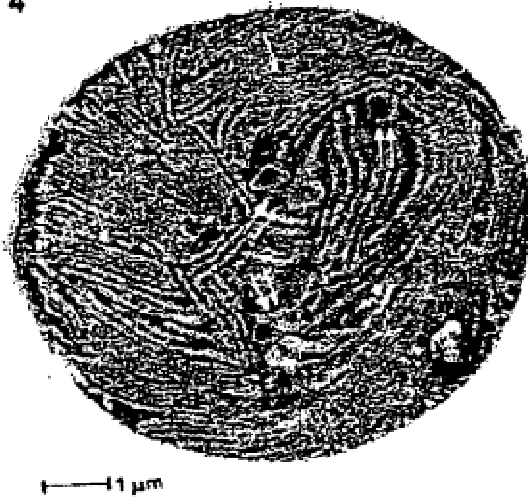


Fig. 4

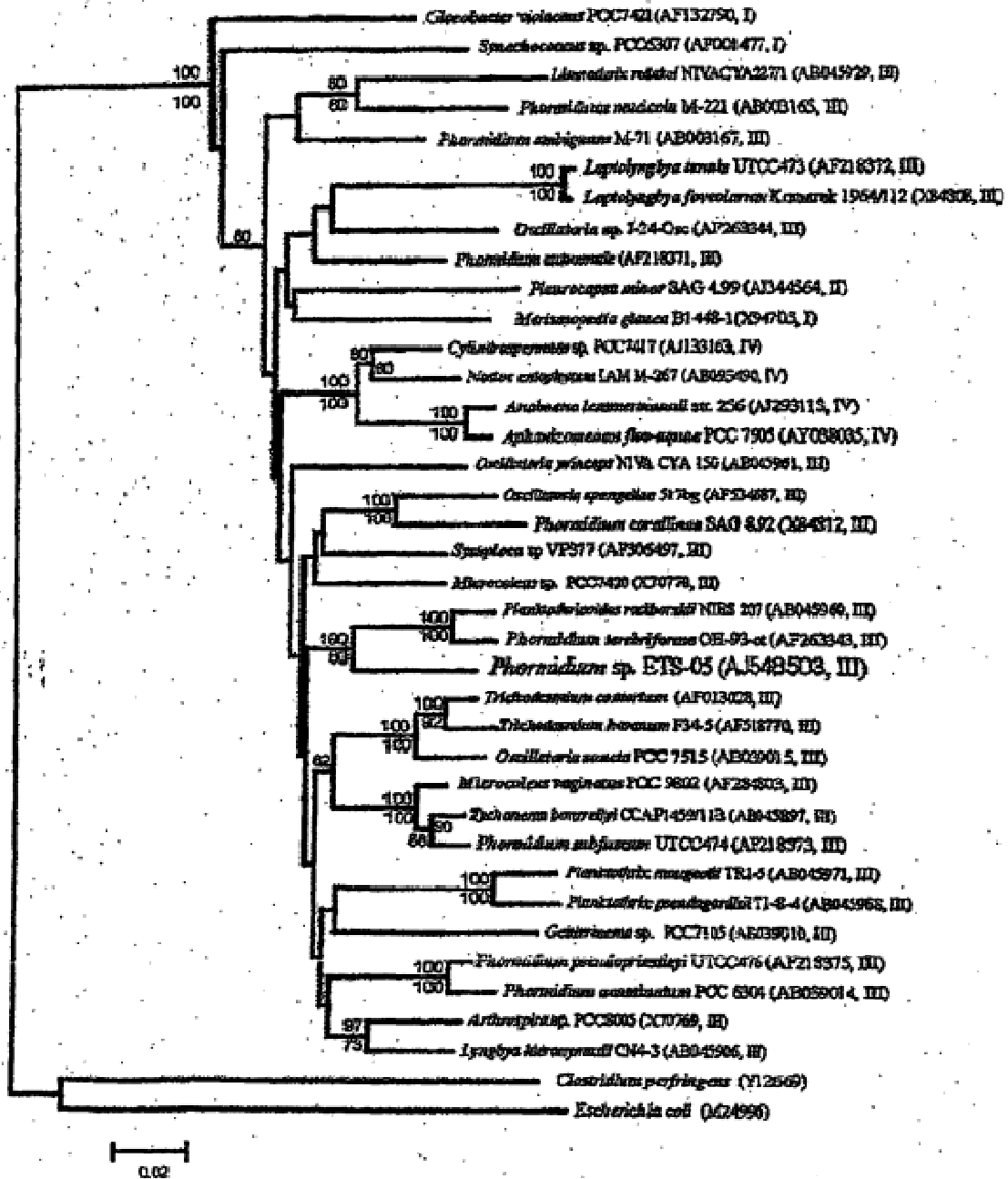


FIG. 5

DGDG (DMSO- d_6 , T 298 K). ^1H : δ 5,107 (1H, H2), 4,90 (1H, OH), 4,73 (2H, OH), 4,686 (1H, H1'''), 4,53 (1H, OH), 4,50 (1H, OH), 4,38 (2H, OH), 4,312 y 4,152 (1H cada uno, H1a, H1b), 4,125 (1H, H1'''), 3,815 y 3,616 (1H cada uno, H3a, H3b), 3,705 (1H, H3'''), 3,705 (H3'''), 3,689 (1H, H3'''), 3,606 (1H, H4'''), 3,581 y 3,542 (1H cada uno, H6'''a, H6'''b), 3,569 (1H, H5'''), 3,566 (1H, H5'''), 3,514 (H2'''), 3,513 y 3,442 (1H cada uno, H6'''a, H6'''b), 3,294 (1H, H2'''), 3,292 (1H, H4'''), 2,281 (4H, H2', H2''), 1,269 (4H, H4', H4''), 1,268 (4H, H14', H14''), 1,245 (4H, H3', H3''), 1,24 (40H, H5'-H14', H5''-H14''), 0,86 (6H, H16', H16''). ^{13}C : δ 173,34 (C1', C1''), 104,29 (C1'''), 100,16 (C1'''), 73,76 (C2'''), 73,70 (C5'''), 71,90 (C4'''), 70,91 (C4'''), 70,52 (C2), 70,17 (C2'''), 69,50 (C3'''), 69,02 (C5'''), 68,57 (C3'''), 67,23 (C3), 67,10 (C6'''), 63,02 (C1), 61,18 (C6'''), 34,07 (C2', C2''), 31,24 (C3', C3''), 29,68 (C5'-C14', C5''-C14''), 29,09 (C4', C4''), 22,72 (C15', C15''), 14,61 (C16', C16'').

MGDG (DMSO- d_6 , T 298 K). ^1H : δ 5,155 (1H, H2), 4,85, 4,70, 4,555 y 4,29 (1H cada uno, OH), 4,332 y 4,181 (1H cada uno, H1a, H1b), 4,102 (1H, H1'''), 3,860 y 3,617 (1H cada uno, H3a, H3b), 3,630 (1H, H3'''), 3,529 y 3,464 (1H cada uno, H6'''a, H6'''b), 3,331 (1H, H5'''), 3,269 (1H, H2'''), 3,267 (1H, H4'''), 2,280 (4H, H2', H2''), 1,508 (4H, H3', H3''), 1,255 (4H, H4', H4''), 1,242 (4H, H15', H15''), 1,24 (40H, H5'-H14', H5''-H14''), 0,860 (6H, H16', H16''). ^{13}C : δ 173,26 (C1'''), 173,17 (C1'), 104,42 (C1'''), 75,92 (C5'''), 73,95 (C4'''), 70,98 (C2'''), 70,56 (C2), 68,61 (C3'''), 67,27 (C3), 63,05 (C1), 60,88 (C6'''), 34,11 (C2', C2''), 29,65 (C5'-C14', C5''-C14''), 29,18 (C4', C4''), 25,04 (C3', C3''), 22,74 (C15', C15''), 14,52 (C16', C16'').

Fig. 6f

Fig. 6 

SQDG (DMSO- d_6 , T 298 K). ^1H : δ 5,42, 4,79, 4,67 (1H cada uno, OH), 5,123 (1H, H2), 4,573 (1H, H1'''), 4,348 y 4,149 (1H cada uno, H3a, H3b), 3,889 y 3,384 (1H cada uno, H1a, H1b), 3,752 (1H, H5'''), 3,334 (1H H4'''), 3,321 (1H, H3'''), 3,221 (1H, H2'''), 2,913 y 2,518 (1H cada uno, H6'''a, H6'''b), 2,321 (4H, H2', H2''), 1,497 (4H, H3', H3''), 1,253 (4H, H15', H15''), 1,249 (4H, H4', H4''), 1,24 (40H, H5'-H14', H5''-H14''), 0,855 (6H, H16', H16''). ^{13}C : δ 174,04 (C1'), 173,82 (C1''), 98,72 (C1'''), 73,93 (C3'''), 73,18 (C4'''), 71,58 (C2'''), 70,07 (C2), 67,81 (C5'''), 65,77 (C3), 62,67 (C1), 53,34 (C6'''), 33,91 (C2', C2''), 29,24 (C4'-C14', C4''-C14''), 24,30 (C3', C3''), 22,17 (C15', C15''), 13,41 (C16', C16'').

ESI: 860 *m/z*.

PG (DMSO- d_6 , T 298 K). ^1H : δ 5,09 (1H, H2), 4,7 y 4,1 (1 H cada uno, OH), 4,30 y 4,10 (1H cada uno, H3a, H3b), 3,83 y 3,63 (1H cada uno, H1a, H1b), 3,65 y 3,61 (2H, H3'''a, H3'''b), 3,54 (H2'''), 3,32 (1H cada uno, H1'''a, H1'''b), 2,271 (4H, H2', H2''), 1,503 (4H, H3', H3''), 1,292 (4H, H15', H15''), 1,252 (4H, H4', H4''), 1,238 (40H, H5'-H14', H5''-H14''), 0,965 (6H, H16', H16''). ^{13}C : δ 173,31 (C1', C1''), 71,90 (C2'''), 71,10 (C2), 67,06 (C3'''), 63,37 (C1), 63,42 (C1'''), 63,12 (C3), 34,43 (C2', C2''), 29,93 (C4'-C14', C4''-C14''), 25,38 (C3', C3''), 23,04 (C15', C15''), 14,85 (C16', C16''). ^{31}P : δ -0,59.

ESI: 745 *m/z*.

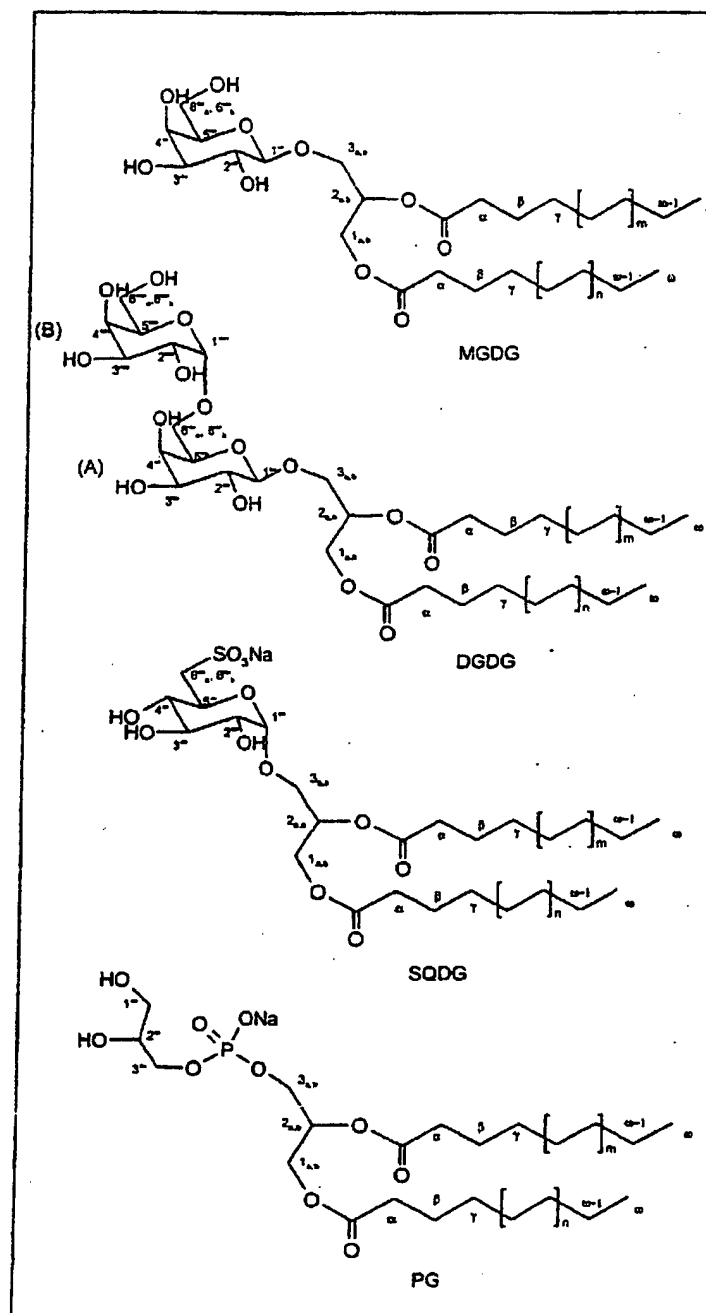


Fig. 7

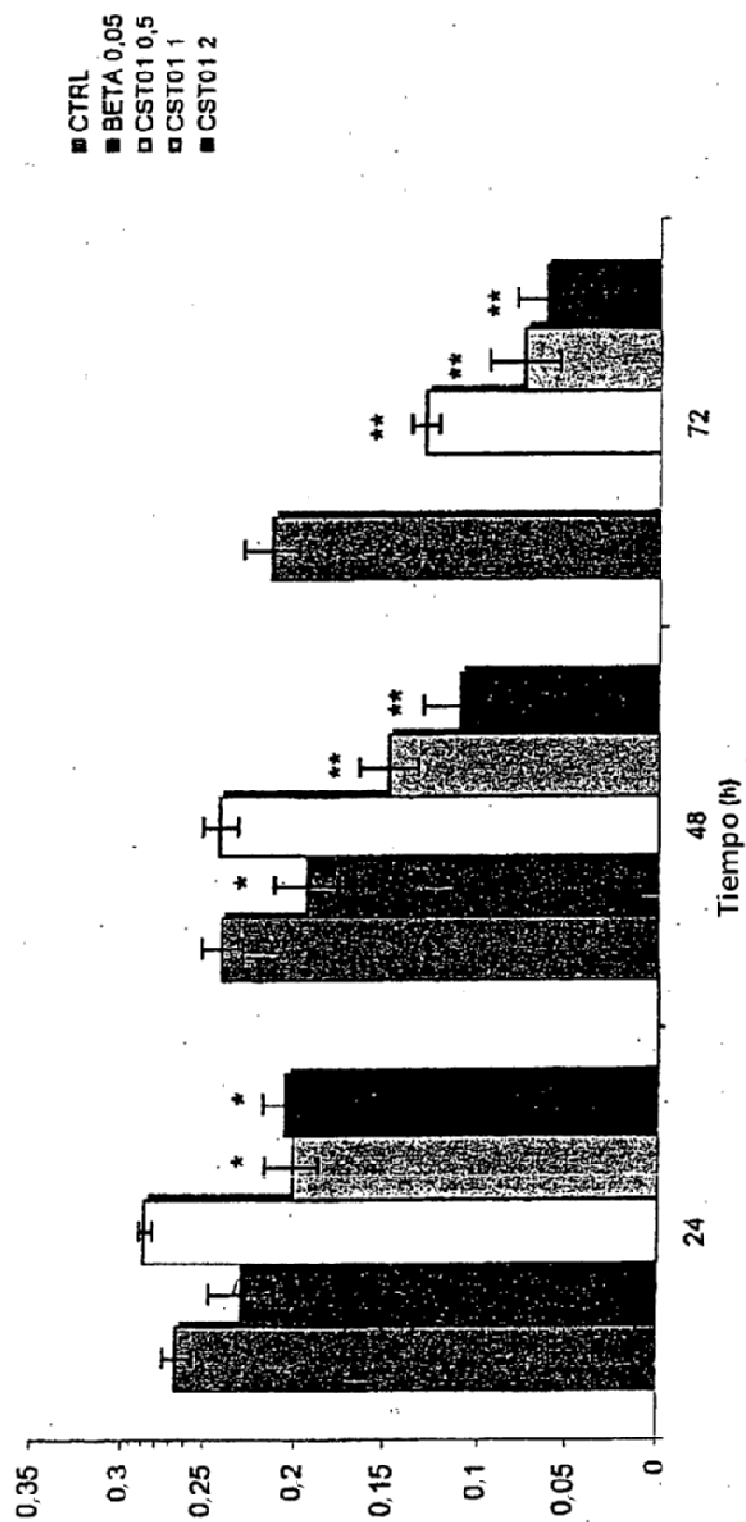


Fig. 8

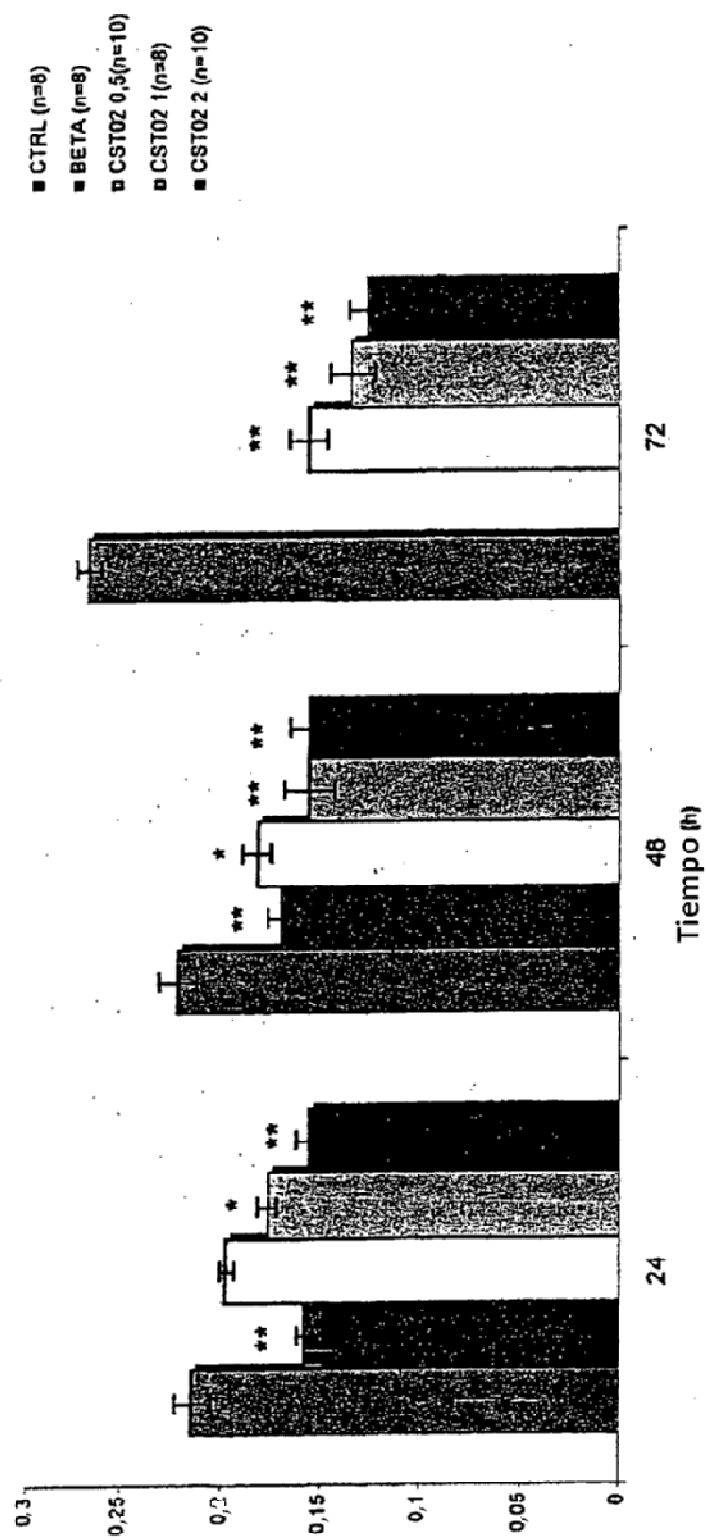


Fig. 9

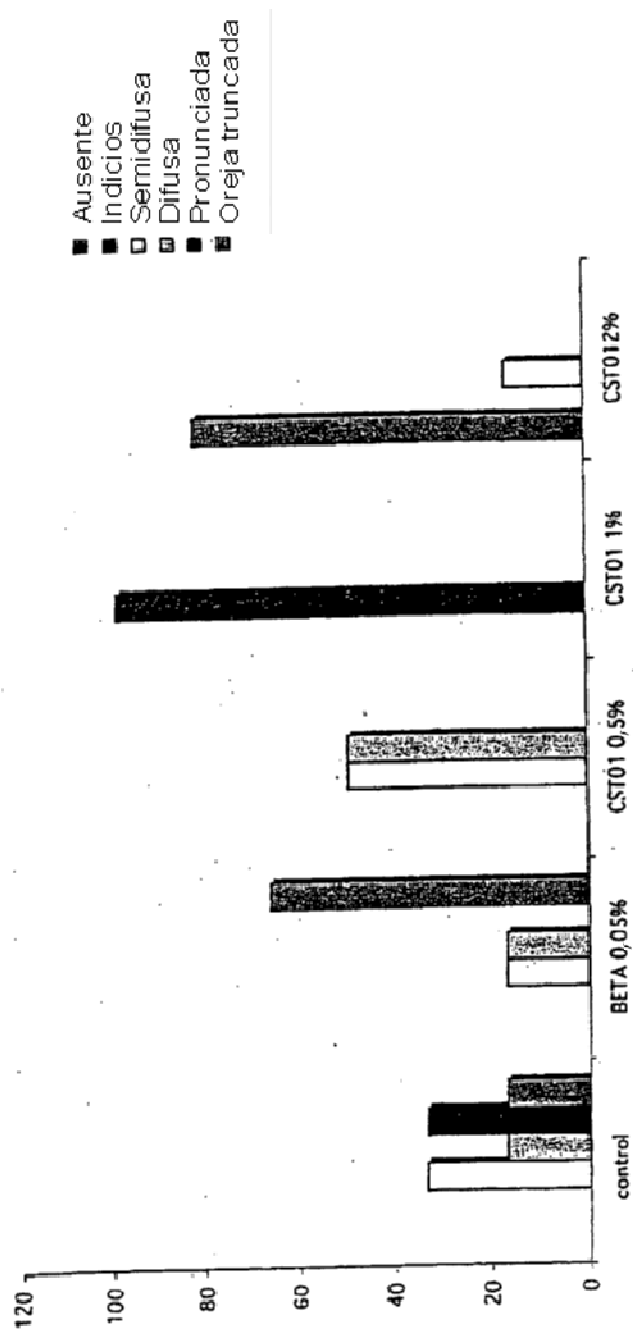


Fig. 10

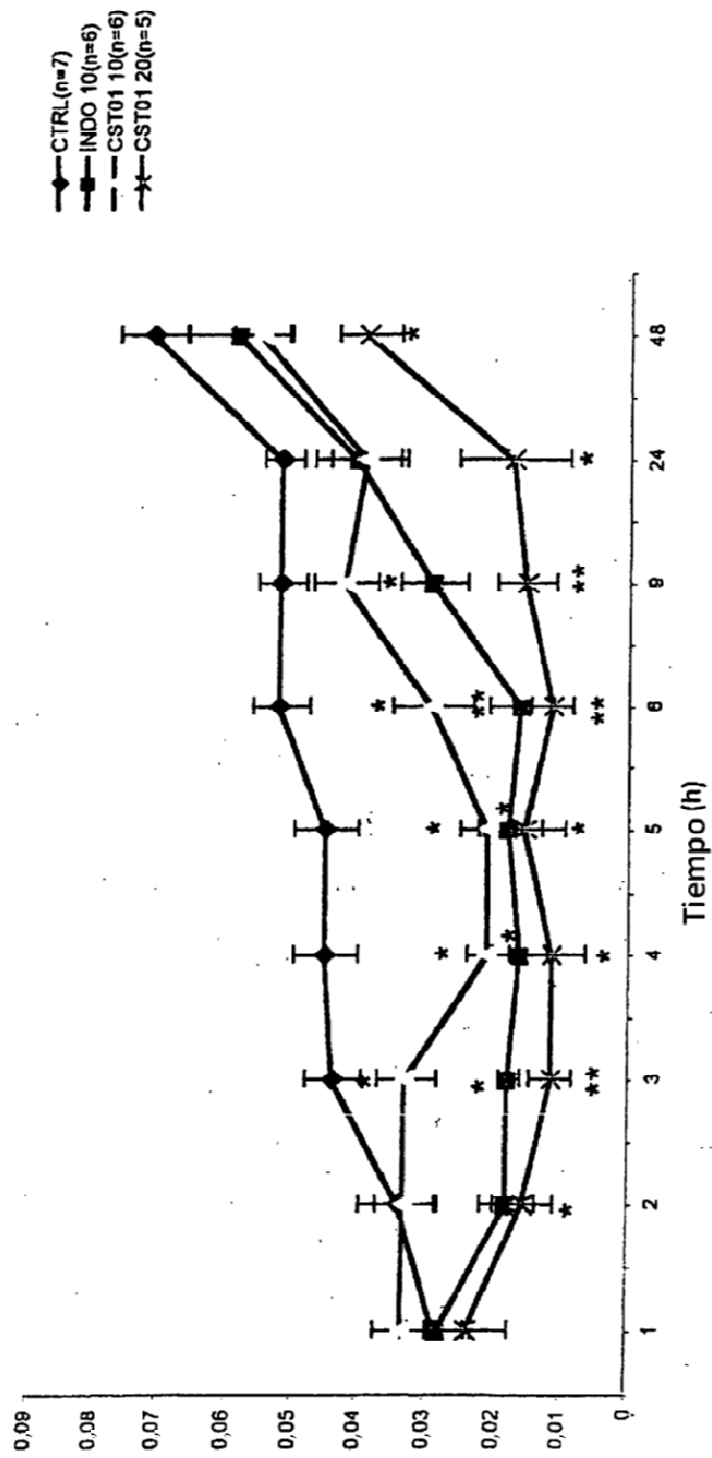


Fig. 11

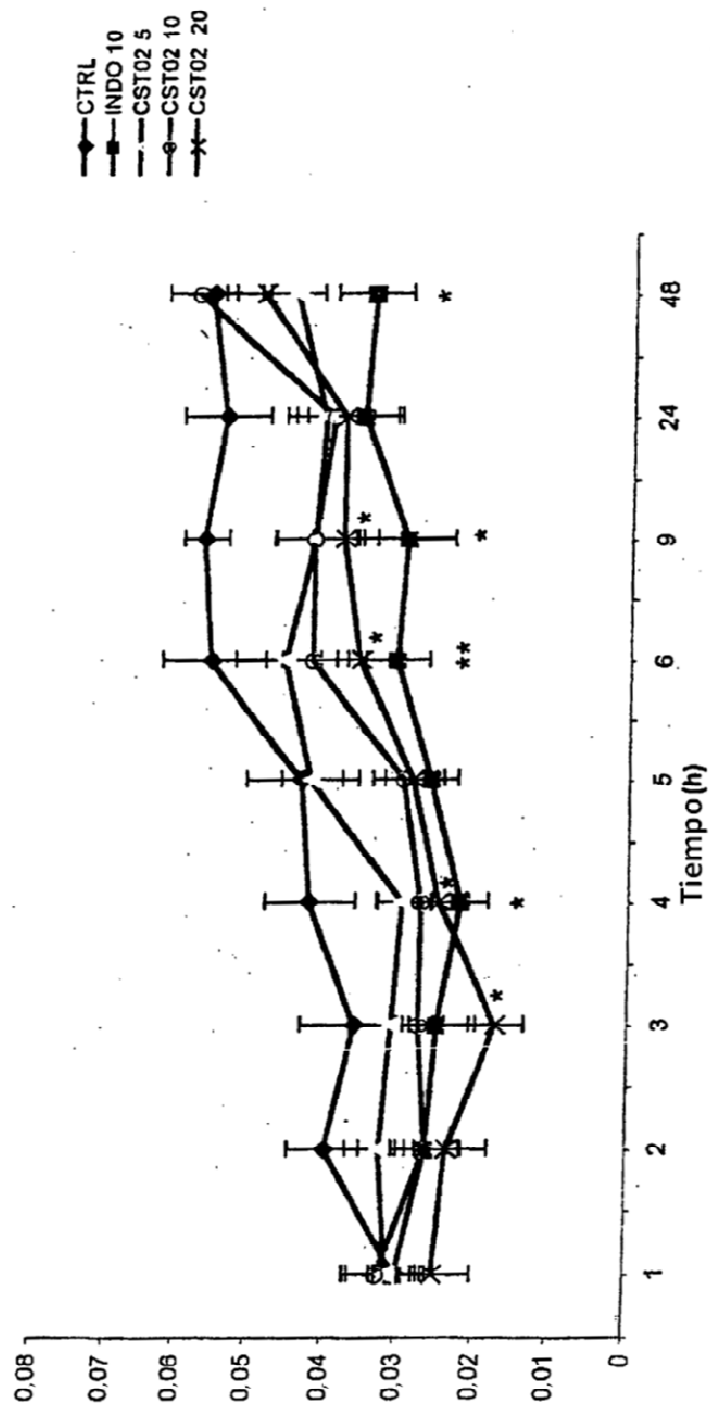


Fig. 12

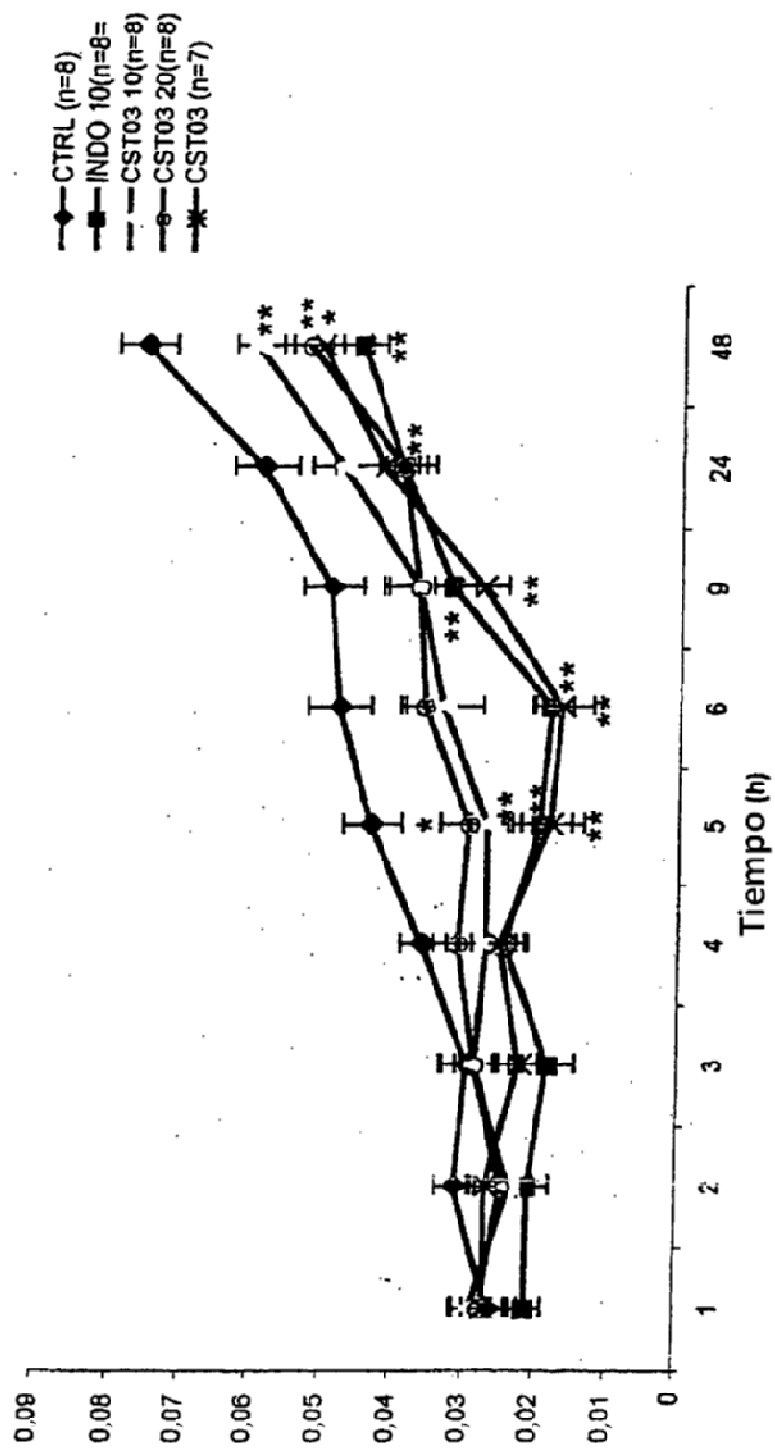


Fig. 13

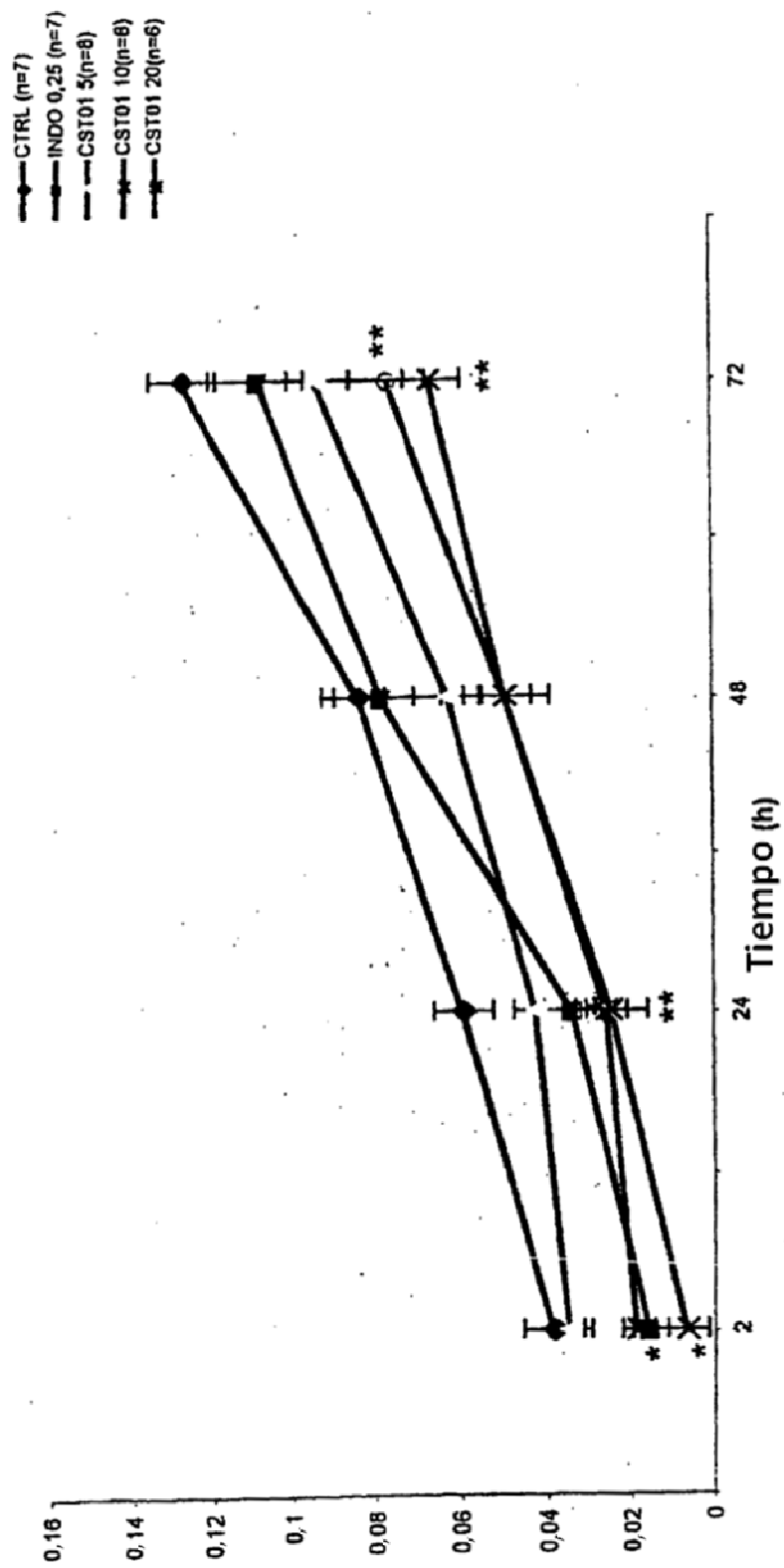


Fig. 14

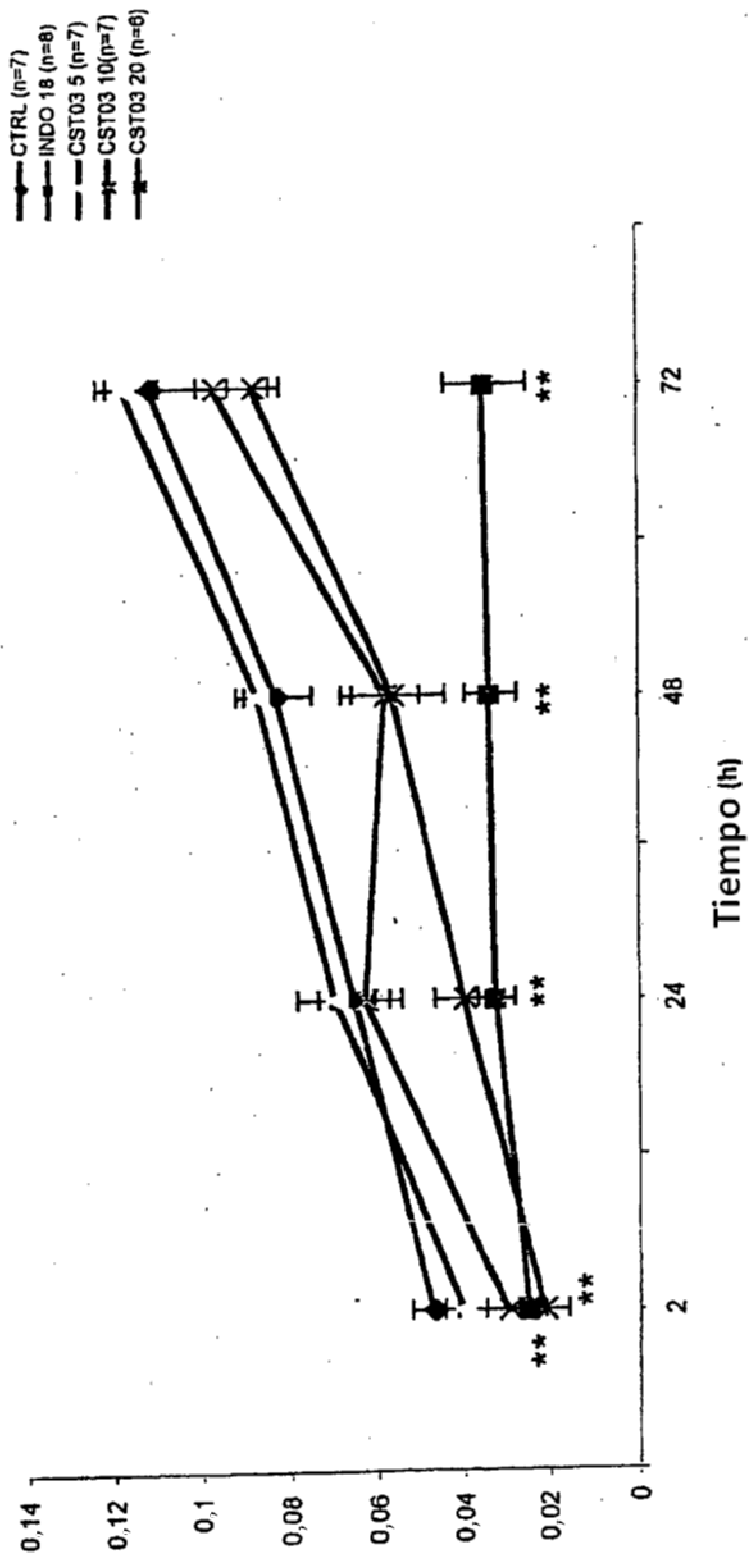


Fig. 15