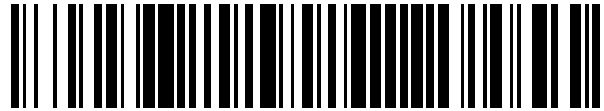


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 486 247**

51 Int. Cl.:

A61K 31/22 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01)
A61K 31/015 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2005 E 05762397 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 1748771**

54 Título: **Composición para prevenir o tratar la degeneración celular utilizando por lo menos una molécula que puede mantener la reversibilidad de la expresión de las moléculas de adherencia y la polimerización de las fibras de actina del endotelio vascular**

30 Prioridad:

23.04.2004 FR 0404344

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

18.08.2014

73 Titular/es:

**AISA THERAPEUTICS (100.0%)
4 RUE PIERRE FONTAINE
91058 EVRY CEDEX, FR**

72 Inventor/es:

D'ALESSIO, PATRIZIA

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 486 247 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

5 Composición para prevenir o tratar la degeneración celular utilizando por lo menos una molécula que puede mantener la reversibilidad de la expresión de las moléculas de adherencia y la polimerización de las fibras de actina del endotelio vascular.

10 La presente invención se refiere al estudio de la reversión de la senescencia de los tejidos por la mediación de las células endoteliales vasculares. Más particularmente, la presente invención se refiere a los efectos de compuestos de origen vegetal de tipo terpeno sobre el endotelio vascular durante episodios inflamatorios. Estos compuestos pueden inhibir la expresión de las moléculas de adherencia endoteliales y la polimerización de las fibras de actina endoteliales durante episodios inflamatorios. Esta inhibición protege los tejidos subyacentes del endotelio de los efectos tóxicos de la inflamación que precipitan su degeneración.

15 En efecto, la inflamación repetida o crónica a nivel del endotelio vascular induce su senescencia acelerada, así como la degeneración de los tejidos sometidos al proceso inflamatorio.

20 La senescencia de una célula es un fenómeno que conlleva un aumento del volumen de la célula, una disminución o una pérdida de la capacidad normal de la célula para dividirse, una disminución de las aptitudes regeneradoras y metabólicas, y un aumento de la actividad de las enzimas celulares de degradación. Todas estas características definen un fenotipo senescente.

Este fenotipo senescente se observó en células jóvenes sometidas a un estrés repetido debido a las reacciones inflamatorias.

25 La fase inicial de la inflamación se desarrolla en la interfaz sangre/tejido, y consiste en el reclutamiento de las células inmunocompetentes, en particular los leucocitos activados. La inflamación consiste en atacar y destruir los microorganismos infecciosos y otros agentes patógenos. Las células inmunocompetentes susceptibles de luchar contra estos microorganismos circulan en la sangre y deben, por lo tanto, entrar en los tejidos para ejercer en ellos su acción; para ello, deben cruzar la barrera de la pared vascular. Lo consiguen siendo reclutadas por las células endoteliales vasculares que cubren los vasos, y que las transferirán a nivel de los tejidos subyacentes. Las células endoteliales vasculares son activadas por unas señales específicas procedentes del tejido infectado o dañado, o directamente por las células inmunocompetentes, y esta activación tiene como efecto aumentar sustancialmente su capacidad de reclutamiento. Se puede medir el estado de activación de las células endoteliales vasculares mediante la aparición de marcadores específicos. En particular, el nivel de expresión de moléculas de adherencia tales como ICAM-1 (INTER CELLULAR ADHESION MOLECULE-1) permite evaluar el estado de actividad de las células endoteliales vasculares que llevan al reclutamiento de las células inmunocompetentes.

40 Otra consecuencia del estrés inflamatorio es la remodelación del citoesqueleto de actina de las células endoteliales vasculares activadas. El estrés inflamatorio conlleva la formación de fibras de actina polimerizadas (denominadas "de estrés") que se puede poner en evidencia mediante el marcado con faloidina acoplada a la rodamina.

45 En una situación normal, en un cultivo celular primario de células endoteliales vasculares, la activación que corresponde a un estado inflamatorio de la célula es reversible. En una situación de senescencia, la célula pierde progresivamente esta reversibilidad y expresa entonces de manera permanente unas moléculas de adherencia, incluso en ausencia de estimulación exterior. Esta pérdida de reversibilidad tiene dos consecuencias: por un lado, el reclutamiento constante de las células inmunocompetentes es una fuente de estrés inflamatorio suplementario para los tejidos y, por otra parte, la célula endotelial vascular posee por lo tanto una disponibilidad incrementada para el reclutamiento de metástasis de tumores, que utilizan las mismas moléculas de adherencia para invadir los tejidos.

50 El documento JP 11-035455 divulga el efecto del geraniol sobre la prevención del envejecimiento de la piel y el tratamiento de heridas.

55 Los documentos DE 19915102 y WO 01178706 muestran el efecto del limoneno sobre el tratamiento del envejecimiento de la piel y el relacionado con la exposición a los rayos UV.

El documento WO 02113840 se refiere a la utilización del limoneno para el tratamiento de la osteoporosis como consecuencia del envejecimiento.

60 Stohs S. J. (Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology (1995), 6 (3/4), 205 - 228) describe el papel del limoneno como captador de radicales libres.

La patente US nº 5.599.546 menciona una mascarilla cosmética que comprende el aceite de limoneno y su utilización para el tratamiento del envejecimiento de la piel.

65 El documento FR 2 671 721 divulga un producto para la repigmentación de los cabellos blancos tras el envejecimiento, que comprende el limoneno y el extracto de *Carum carvi*.

El compendio Derwent WPI 2004-160857 muestra la utilización del geraniol para el tratamiento del envejecimiento.

5 Otro compendio Derwent, WPI 2002-169193 se refiere a la utilización del limoneno y del geraniol para el tratamiento de asma, psoriasis, artritis, inflamación de los intestinos, artritis reumatoide, rinitis alérgica, por inhibición de la producción de leucotrienos.

10 El documento DE 19644422 describe la utilización del limoneno, del geraniol y de otros terpenos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes por inhibición de la activación de los linfocitos T.

15 El documento US 2003/104089 divulga un extracto que comprende limoneno y su utilización para la prevención de las metástasis de tumores por inhibición de la expresión de ciclina D1.

20 El documento WO 99/35116 describe la utilización de una composición que comprende unos diterpenos de fórmula (I), y eventualmente limoneno, para el tratamiento de condiciones inflamatorias, autoinmunes y alérgicas por inhibición de reacciones de hipersensibilidad relacionadas con las inmunoglobulinas o con los antígenos.

25 El compendio Derwent WPI 1993-005497 muestra la utilización del acetato de geraniol para el tratamiento de dermatitis inflamatorias provocadas por unas alergias por inhibición de reacciones de hipersensibilidad.

30 El documento US 2003/199592 se refiere a la utilización del limoneno para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, la senescencia de las células endoteliales o de otros mecanismos que no son mencionados.

35 La patente US nº 6.177.472 divulga la utilización de la isomentona para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer por inhibición de la liberación de ácido graso para regular el ensamblaje de la proteína Tau.

40 Por lo tanto, la presente invención tiene por objeto la utilización de una molécula seleccionada de entre el grupo que comprende el acetato de geraniol, el geraniol, la isomentona, el limoneno, o la mezcla de por lo menos dos de ellos, para la preparación de un medicamento útil para prevenir o tratar la degeneración de los tejidos asociada a la senescencia de las células endoteliales vasculares inducida por unos episodios inflamatorios repetidos.

45 Estas moléculas tienen en común su capacidad para inhibir la activación irreversible de las células endoteliales vasculares y mantener estas células en un estado de activación funcional en el que son capaces de responder a un estímulo ambiental y volver después a su estado básico. Estas moléculas son capaces de invertir el fenotipo senescente de la célula endotelial vascular cuando ya se ha encontrado, y son por lo tanto citoprotectoras, ya que protegen las células de los tejidos subyacentes de los efectores inflamatorios segregados por las células inmunocompetentes activadas, lo que impide así su degeneración. La utilización según la invención hace intervenir por lo menos una molécula que posee esta capacidad.

50 Estas moléculas están contenidas o proceden de aceites esenciales de origen vegetal. Ventajosamente, son aisladas y purificadas o son preparadas por síntesis químicas.

55 El acetato de geraniol es el acetato de (E)-3,7-dimetil-2,6-octadienilo (CAS: 105-87-3). Está presente, entre otros, en los aceites esenciales de rosa, de citronela, de nardo indio (lemon grass), de geranio y de nerolí.

60 El geraniol es el (E)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (CAS: 106-24-1). Está presente, entre otros, en los aceites esenciales de rosa, de nerolí y de geranio.

65 La isomentona es la cis-2-isopropil-5-metilciclohexanona (CAS: 491-07-6), presente, entre otros, en los aceites esenciales de la menta y del geranio.

El limoneno es el (4R)-1-metil-4-isopropenilciclohex-1-eno (CAS: 5989-27-5). Está presente, entre otros, en los aceites esenciales del limón y del nerolí.

70 Ventajosamente, estas moléculas son utilizadas según la invención en una composición en la que están presentes en unas cantidades muy bajas.

75 Según una primera forma de realización, la invención se refiere a la senescencia de las células endoteliales vasculares inducida por unos episodios inflamatorios repetidos relacionados con la presencia de células cancerosas. Por lo tanto, la invención se refiere a la preparación de un medicamento para tratar la exportación de las metástasis favorecida por una sobreexpresión de las moléculas de adherencia por el endotelio vascular y una polimerización de la actina endotelial vascular, que son responsables del reclutamiento de las células cancerosas potencialmente metastáticas.

80 Según una segunda forma de realización, la invención se refiere a la senescencia de las células endoteliales vasculares y en segundo lugar de la degeneración de los tejidos que son inducidos por unos episodios inflamatorios

repetidos que provienen de la exposición al sol (UV), de la polución, de la microabrasión. Por lo tanto, la invención se refiere a la preparación de un medicamento para tratar las afecciones dermatológicas así como las alergias cutáneas relacionadas con los fenómenos anteriores que conllevan una sobreexpresión de las moléculas de adherencia por el endotelio vascular y una polimerización de la actina endotelial vascular, asociados a los episodios inflamatorios que inducen la degeneración de los tejidos dérmicos.

Según una tercera forma de realización, la invención se refiere a la senescencia de las células endoteliales vasculares y en segundo lugar de la degeneración de los tejidos subyacentes que son inducidos por unos episodios inflamatorios repetidos asociados a las enfermedades inflamatorias crónicas o a las enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, la invención se refiere a la preparación de un medicamento para tratar las patologías inflamatorias crónicas o autoinmunitarias que conllevan una sobreexpresión de las moléculas de adherencia por el endotelio vascular y una polimerización de la actina endotelial vascular, y que inducen la degeneración de los tejidos subyacentes.

Una patología inflamatoria crónica o autoinmunitaria se selecciona de entre el grupo que comprende la poliartritis reumatoide, la osteoartritis, las espondiloartritis, la gota, la artrosis y todas las demás formas de artritis, la hepatitis crónica, la rectocolitis hemorrágica, la enfermedad de Crohn, las vasculitis, la esclerosis múltiple, la psoriasis, los lupus eritematosos y cutáneos así como las esclerodermias.

Según una cuarta forma de realización, la invención se refiere a la senescencia de las células endoteliales vasculares y en segundo lugar de la degeneración de los tejidos que son inducidos por unos episodios inflamatorios repetidos asociados a las enfermedades degenerativas. Por lo tanto, la invención se refiere a la preparación de un medicamento para tratar las enfermedades degenerativas cerebrales que están asociadas a una sobreexpresión de las moléculas de adherencia por el endotelio vascular y una polimerización de la actina endotelial vascular que inducen la degeneración de los tejidos cerebrales.

Una patología degenerativa cerebral se selecciona de entre el grupo que comprende la enfermedad de Alzheimer, las demencias seniles vasculares o mixtas, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington.

Ventajosamente, este medicamento es administrable por vía tópica, oral, entérica, parenteral o por inhalación.

Otras ventajas y características de la invención aparecerán con los ejemplos siguientes, que se refieren a la inhibición de las moléculas de adherencia y de la polimerización de la actina de las células endoteliales vasculares bajo la acción del acetato de geranilo, del geraniol, de la isomentona o del limoneno. Se hará referencia en estos ejemplos a los dibujos adjuntos, en los que:

1/ Acetato de geranilo figuras 1, 2, 3A, 3B

- la figura 1 muestra el porcentaje de inhibición de la expresión de ICAM-1 de las células HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) en diferentes etapas de replicación (P1, P2 que corresponden a unas poblaciones de células jóvenes, poco replicadas, y P9 a unas células que han alcanzado el límite de sus índice de replicación, por lo tanto senescentes), por el acetato de geranilo al 0,004% tras una estimulación por el TNF- α a la concentración de 10 ng/ml durante 24 horas.
- la figura 2 muestra el porcentaje de inhibición de la expresión de ICAM-1 de las células HUVEC en diferentes etapas de replicación por el acetato de geranilo al 0,001% o al 0,002% tras una estimulación por TNF- α a la concentración de 10 ng/ml durante 24 horas.
- la figura 3A muestra la toxicidad del acetato de geranilo, ensayado a diferentes concentraciones sobre unas células HAEC (HUMAN AORTIC ENDOTHELIAL CELLS), siendo la toxicidad expresada en % de mortalidad de las células endoteliales HAEC a 24h y 48h.
- la figura 3B muestra la toxicidad del acetato de geranilo, ensayado a diferentes concentraciones sobre unas células HUVEC, siendo la toxicidad expresada en % de mortalidad de las células endoteliales HUVEC a 24h y 48h.

2/ Geraniol, figuras 4, 5, 6A y 6B

- la figura 4 muestra el porcentaje de inhibición de la expresión de ICAM-1 de las células HUVEC en diferentes etapas de replicación por el geraniol al 0,002% y al 0,004% tras una estimulación por TNF- α a la concentración de 10 ng/ml durante 24 horas.
- la figura 5 muestra el porcentaje de inhibición de la expresión de ICAM-1 de las células HUVEC en diferentes etapas de replicación por el geraniol al 0,001% y al 0,002% tras una estimulación por TNF- α a la concentración de 10 ng/ml durante 24 horas.

- la figura 6A muestra la toxicidad del geraniol, ensayado a diferentes concentraciones sobre unas células HUVEC, siendo la toxicidad expresada en % de mortalidad de las células endoteliales HUVEC a 24h y 48h.
- la figura 6B muestra la toxicidad del geraniol, ensayado a diferentes concentraciones sobre unas células HAEC, siendo la toxicidad expresada en % de mortalidad de las células endoteliales HAEC a 24h y 48h.

3/ Limoneno, figuras 7, 8A, 8B

- la figura 7 muestra el porcentaje de inhibición de la expresión de ICAM-1 de las células HUVEC en diferentes etapas de replicación por el limoneno al 0,002% y al 0,004% tras una estimulación por el TNF- α a la concentración de 10 ng/ml durante 24 horas.
- la figura 8A muestra la toxicidad del limoneno, ensayado a diferentes concentraciones sobre unas células HUVEC, siendo la toxicidad expresada en % de mortalidad de las células endoteliales HUVEC a 24h y 48h.
- la figura 8B muestra la toxicidad del limoneno, ensayado a diferentes concentraciones sobre unas células HAEC, siendo la toxicidad expresada en % de mortalidad de las células endoteliales HAEC a 24h y 48h.

4/ iso-mentona, figuras 9, 10A, 10B

- la figura 9 muestra el porcentaje de inhibición de la expresión de ICAM-1 de las células HUVEC a diferentes etapas de replicación por la iso-mentona al 0,001% y al 0,002% tras una estimulación por el TNF- α a la concentración de 10 ng/ml durante 24 horas.
- la figura 10A muestra la toxicidad de la iso-mentona, ensayada a diferentes concentraciones sobre unas células HUVEC, siendo la toxicidad expresada en % de mortalidad de las células endoteliales HUVEC a 24h y 48h.
- la figura 10B muestra la toxicidad de la iso-mentona, ensayada a diferentes concentraciones sobre unas células HAEC, siendo la toxicidad expresada en % de mortalidad de las células endoteliales HAEC a 24h y 48h.

Las figuras 11 a 25 representan el estudio de la toxicidad *in vivo* de las moléculas "NAT" y "SYN" formas natural y sintética del acetato de geraniol, molécula denominada "AISA 5201" y seleccionada en cuanto a su representatividad de la clase AISA, en un modelo murino sobre los parámetros de la numeración sanguínea, a unas concentraciones de 5, 10, 25 y 50 microgramo/ratón, correspondientes a unas concentraciones no tóxicas *in vitro*, que permiten observar el efecto biológico deseado, es decir la inhibición de la adherencia endotelial, así como la polimerización de la actina endotelial.

Ejemplo 1

Los ensayos se realizan sobre unas células endoteliales de diferentes orígenes (de la vena de cordón (HUVEC), de la microcirculación de la piel (HMVEC), y de la aorta (HAEC)), que han sido sometidas a diferentes presiones (H_2O_2 , Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) durante 2 horas, 6 horas, 24 horas y 48 horas) lo que induce la activación de estas células. La activación se mide analizando la expresión de los marcadores tales como ICAM-I, VCAM-I (VASCULAR ADHESION MOLECULE-1), mediante las tres técnicas siguientes: ensayo ELISA, citometría de flujo, inmunomicroscopía confocal de fluorescencia.

Ejemplo 2

Dosificación inmunoenzimática ELISA: después de la estimulación por TNF- α , las células se lavan con PBS y después se fijan con formaldehído al 2% durante 10 minutos. Los sitios de fijación no específicos son después saturados por leche desnatada al 5%. Las células son después incubadas con el anticuerpo primario anti-ICAM-I (R&D) a 0,02 μ g/ml durante dos horas a temperatura ambiente, y después lavadas cinco veces con PBS. Después, se incuban con el complejo de revelación, anti-IgG de ratón unido a la fosfatasa alcalina (Chemicon, Euromedex) durante una hora a temperatura ambiente, y después se lavan cinco veces con PBS. La revelación colorimétrica se realiza por el sustrato de la fosfatasa alcalina, el para-nitrofenilfosfato a 1 mg/ml. La reacción se detiene después de 20 minutos de incubación por NaOH 1M. La lectura se lleva a cabo con el lector de placas a 405 nm.

La citometría de flujo mide asimismo la expresión de las proteínas marcadas por un anticuerpo específico, llevando el anticuerpo esta vez un grupo fluorescente. El ELISA permite una medición global de la expresión de las moléculas de adherencia, permitiendo la citometría de flujo eventualmente discriminar unas subpoblaciones que presentan un perfil de expresión variable. Las células se lavan con PBS que contiene entre el 0,5-2% de albúmina de suero bovino, y después se resuspenden en una solución de PBS-BSA que contiene una concentración óptima de anticuerpos antimoléculas de adherencia acoplados a un fluoróforo. Después del lavado, la suspensión de células es sometida al citómetro de flujo, que mide la fluorescencia específica asociada al anticuerpo utilizado para el marcado.

Alternativamente, las células pueden sufrir una posfijación (con PBS-BSA que contiene el 2% de paraformaldehído) después de las etapas de lavados finales para una medición diferida en los siete días siguientes.

Ejemplo 3

5 La inmunomicroscopía confocal de fluorescencia es un método de puesta en evidencia simultánea de la red de actina (por rodamina acoplada con faloidina) y de moléculas de adherencia ICAM-1 o VCAM-1 por marcado con un anticuerpo acoplado a FITC en unas células endoteliales vasculares. La senescencia replicativa está asociada a unas modificaciones de las interacciones entre moléculas de adherencia y el citoesqueleto de actina de las células endoteliales vasculares, que la implementación de esta media permite evaluar. Las células son cultivadas en unas láminas de vidrio en unos pocillos de cultivo. Después de 2, 6 o 24 horas de estimulación por TNF- α , las células se lavan con PBS, y después se fijan con paraformaldehído al 2%. Los sitios de fijación no específicos de los anticuerpos son después saturados por cloruro de amonio a 50 mM, y después las células son permeabilizadas por la saponina al 0,01%. Las láminas con las células fijadas se ponen después en contacto con el anticuerpo primario: anti-ICAM-1 acoplado a FITC (DIACLONE) y a la Rodamina (SIGMA P1951 PHALLOIDIN TRICT), durante 1h30, después se lavan 2 veces con PBS. En el caso de un marcado con VCAM-1, las células se ponen en contacto con el anticuerpo primario: anti-VCAM-1 (IMMUNOTECH) durante 1h30 y después se lavan 2 veces con PBS. Se incuban entonces con el anticuerpo secundario fluorescente: anti-ratón Ig, "fluoresceine linked whole antibody" (AMERSHAM) y la rodamina (SIGMA P1951 PHALLOIDIN TRICT), durante 1h30 y después se lavan 2 veces con PBS. Las láminas son introducidas a continuación en glicerol sobre unas láminas, y después se observan en microscopía óptica o confocal.

Estas técnicas permiten identificar, para una célula endotelial vascular, la entrada en la fase de senescencia replicativa caracterizada por la irreversibilidad de la polimerización de la actina asociada a la sobreexpresión irreversible de moléculas de adherencia inducida por el proceso replicativo fisiológico y/o el estrés inflamatorio, mimetizado en los ensayos por una estimulación con TNF- α y/o H₂O₂.

Los ensayos descritos en los ejemplos 2 y 3 permiten caracterizar y cuantificar el potencial de una molécula para inhibir la expresión de las moléculas de adherencia y la polimerización de la actina, lo que corresponde a una inversión del fenotipo de tipo senescente de la célula endotelial vascular.

Ejemplo 4

Estudio preliminar de toxicidad sobre una cepa de ratón salvaje, en diferentes concentraciones de la molécula que corresponden a las concentraciones utilizadas *in vitro*.

Tras los resultados *in vitro* obtenidos anteriormente, se procedió a unos estudios *in vivo* preliminares sobre la toxicidad posible y las propiedades funcionales de la molécula de acetato de geranilo aquí denominada "AISA-5201".

Se conoce la toxicidad aguda de la molécula sintética. En la rata, la DL50 es de 6330 mg/kg, con diversas alteraciones del comportamiento, que va de la somnolencia al coma.

Para el estudio de toxicidad preliminar, se utilizó una cepa de ratón denominado "C57BL6". Esta cepa está conocida por su DL50 para el LipoPoliSacárido bacteriano (LPS) de 600 microgramo/ratón ("Lipopolysaccharide-Induced Cytokine Cascade and Lethality in Lta/TNF α -Deficient Mice" F. Amiot *et al.* 1997, Molecular Medicine vol. 3 n^o 12, 863-874), que corresponde a una DL50 de 3000 mg/kg.

Se siguieron dos protocolos, uno con la forma sintética denominada aquí "SYN" (catálogo SIGMA, código del producto 173495) y el otro con la forma natural no filtrada (procedente del tratamiento por HPLC a partir de aceites esenciales de geranio) denominada aquí "NAT" de dicha molécula.

En base a los experimentos de toxicidad *in vitro*, en una primera etapa, las moléculas "SYN" y "NAT" se ensayaron sobre los ratones C57BL/6 a unas concentraciones de 10, 25 y 50 microgramos/ratón, así como un grupo de control que recibió PBS, en modo de administración IP (intraperitoneal) y retro-orbital (IV). Cada lote estaba constituido de 4 animales, con un total de 16 animales utilizados.

Al final del experimento, se efectuó una numeración sanguínea sobre la máquina Cell Dyn Systems 3500/3700 Abbott Laboratories. Esta investigación se completó para poner en evidencia unas eventuales alteraciones funcionales. Los resultados de este experimento, en cualquier forma "NAT" y "SYN" de la molécula confundida, permitió poner en evidencia que la concentración de 50 microgramos/ratón era la más apropiada, ya que los marcadores de la línea blanca (WBC, NEU, LYM, MONO) y unas plaquetas (PLT) se mantenían con unos valores cercanos a los del grupo de control. Los marcadores de la línea roja (RBC, HBG y HTC) eran, por otra parte, estables a cualquier concentración ensayada (figuras 11 a 15).

Se realizó un segundo experimento, utilizando sólo la molécula de síntesis, a concentraciones de 5, 10 y 20 microgramos/ratón más un grupo de control, de nuevo con 4 animales por grupo, en modo IP únicamente.

Después, al final del experimento, como en el experimento anterior, se efectuó una numeración sanguínea. Los resultados (figuras 16 a 20) muestran bien que la molécula "SYN" a la concentración ensayada es estable, manteniéndose a los valores del rango estándar.

5 Se efectuó un tercer experimento para ensayar la molécula "NAT" a las mismas concentraciones que la "SYN", pero aumentando el número de animales, es decir 5 animales por grupo. Los resultados (figuras 21 a 25) muestran bien que la molécula "NAT" a las concentraciones ensayadas es estable, manteniéndose a los valores del rango estándar.

10 Las moléculas "NAT" y "SYN" en formas natural y sintética del acetato de geranilo, molécula denominada "AISA 5201" y seleccionada como tal por su representatividad de la clase AISA, son comparables, en lo que se refiere a su no toxicidad *in vivo* en un modelo murino sobre los parámetros de la numeración sanguínea, a unas concentraciones de 5, 10, 25 y 50 microgramos/ratón, correspondientes a unas concentraciones no tóxicas *in vitro*, lo que permite observar el efecto biológico deseado, es decir, la inhibición de la adherencia endotelial, así como de la
15 polimerización de la actina endotelial.

La tabla 1 siguiente proporciona los valores estándares de la numeración sanguínea en el ratón C57/BL6.

Tabla 1

20

	Dosis de 10 ug	Dosis de 25 ug	Dosis de 50 ug	Control
Rango WBC	8,13 -11,3	7,10 - 7,79	3,29 -6,79	0,708 3,63
Rango NEU	0,907 0,816	1,76 - 1,94	0,476 1,46	0,347 0,868
Rango LYM	5,94 - 7,55	4,47 - 5,30	1,52 -5,36	0,255 -2,23
Rango MONO	0,422 0,458	0,519 0,725	0,247 0,300	0,089 0,286
Rango EOS	0,009 0,015	0,003 -0,044	0,005 0,014	0,007 0,008
Rango BASO	0,044-0,076	0,029-0,098	0,033-0,057	0,008-0,021
Rango RBC	8,34 - 8,66	6,62 - 8,20	6,64 -7,55	6,80 -8,63
Rango HGB	13,1 - 13,2	10,3 - 12	10,3 -11,4	10,6 -12,3
Rango HCT	38,1 - 39,6	30,2 - 36,6	31,5 -33,4	31,1 -38,8
Rango MCV	44,4 - 45,6	44,6 - 44,6	43,7 -44,2	44,8 -44,9
Rango MCH	15 - 15,1	14,6 - 14,6	14,7 -15,1	14,6 -15,1
Rango MCHC	32,9 - 33,5	32,7 - 32,7	32,6 -33,7	32,6 -33,6
Rango RDW	15,6 - 16	16,1 - 17	15,3 -16,9	15,8 -16,5
Rango PLT	1089 -1091	1289 -1508	1220 -1282	768 - 966
Rango MPV	8,71 - 8,87	8,63 - 8,75	8,32 -8,65	8,79 -9,66
Rango WIC	8,47 - 11,3	7,57 - 13,8	4,44 -7,27	0,847 3,63
Rango WOC	7,82 - 8,13	6,58 - 12	3,29 -6,46	0,708 2,89

REIVINDICACIONES

- 5 1. Compuesto de origen vegetal de tipo terpeno para su utilización para prevenir o tratar la degeneración del tejido asociada a la senescencia de las células endoteliales vasculares inducida por unos episodios inflamatorios repetidos.
- 10 2. Compuesto de origen vegetal de tipo terpeno para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto de origen vegetal de tipo terpeno se selecciona de entre el grupo que comprende el acetato de geraniol, el geraniol, la isomentona y el limoneno.
- 15 3. Compuesto de origen vegetal de tipo terpeno para su utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el compuesto de origen vegetal de tipo terpeno se aísla y purifica o se prepara por síntesis.
- 20 4. Compuesto de origen vegetal de tipo terpeno para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su utilización para prevenir o tratar la exportación de las metástasis de tumores por las células endoteliales vasculares senescentes.
- 25 5. Compuesto de origen vegetal de tipo terpeno para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su utilización para tratar las afecciones dermatológicas y las alergias cutáneas relacionadas con la polución, con las microabrasiones, que conllevan una sobreexpresión de las moléculas de adherencia por el endotelio vascular y una polimerización de la actina endotelial vascular.
- 30 6. Compuesto de origen vegetal de tipo terpeno para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su utilización para tratar una patología inflamatoria crónica o autoinmunitaria que conlleva una sobreexpresión de las moléculas de adherencia por el endotelio vascular y una polimerización de la actina endotelial vascular.
- 35 7. Compuesto de origen vegetal de tipo terpeno para su utilización según la reivindicación 6, caracterizado porque la patología inflamatoria crónica o autoinmunitaria se selecciona de entre el grupo que comprende la poliartritis reumatoide, la osteoartritis, las espondiloartritis, la gota, la artrosis y cualquier otro forma de artritis, la hepatitis crónica, la rectocolitis hemorrágica, la enfermedad de Crohn, las vasculitis, la esclerosis múltiple, la psoriasis, los lupus eritematosos y cutáneos, así como las esclerodermias.
- 40 8. Compuesto de origen vegetal de tipo terpeno para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su utilización para tratar las enfermedades degenerativas cerebrales que están asociadas a una sobreexpresión de las moléculas de adherencia por el endotelio vascular y una polimerización de la actina endotelial vascular.
9. Compuesto de origen vegetal de tipo terpeno para su utilización según la reivindicación 8, caracterizado porque la patología degenerativa cerebral se selecciona de entre el grupo que comprende la enfermedad de Alzheimer, las demencias seniles vasculares o mixtas, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington.
10. Compuesto de origen vegetal de tipo terpeno para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque dicho compuesto se administra por vía tópica, oral, entérica, parenteral o por inhalación.

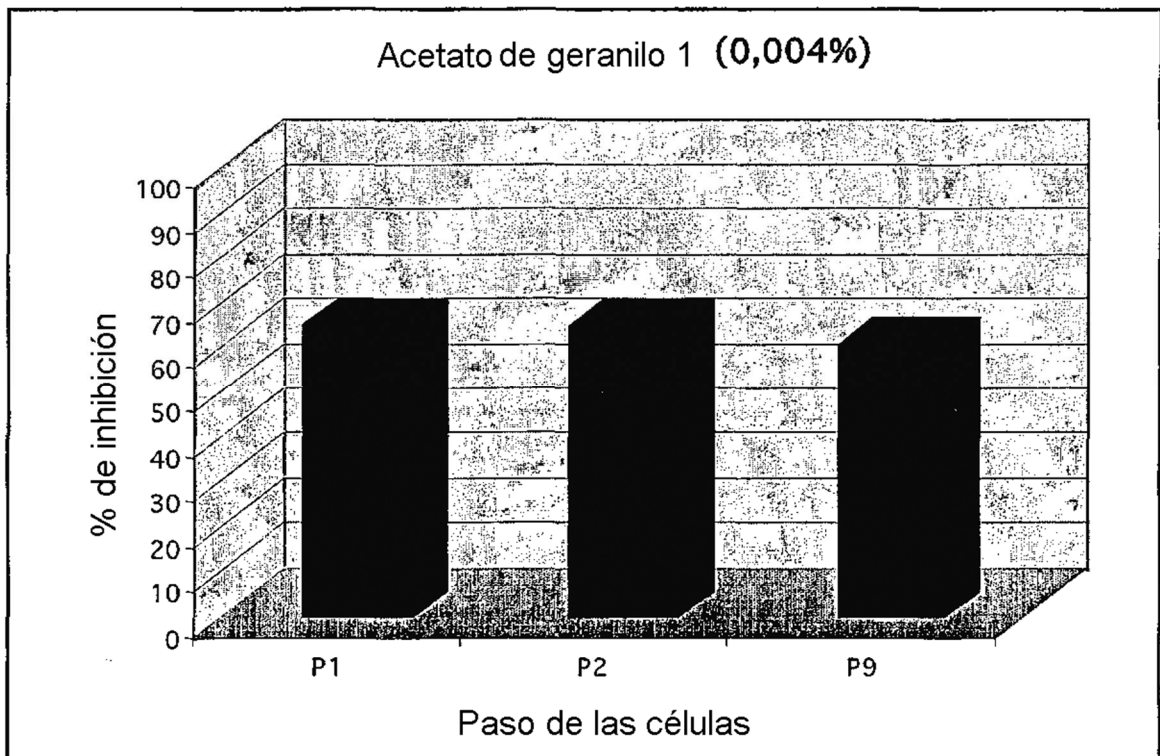


Figura 1

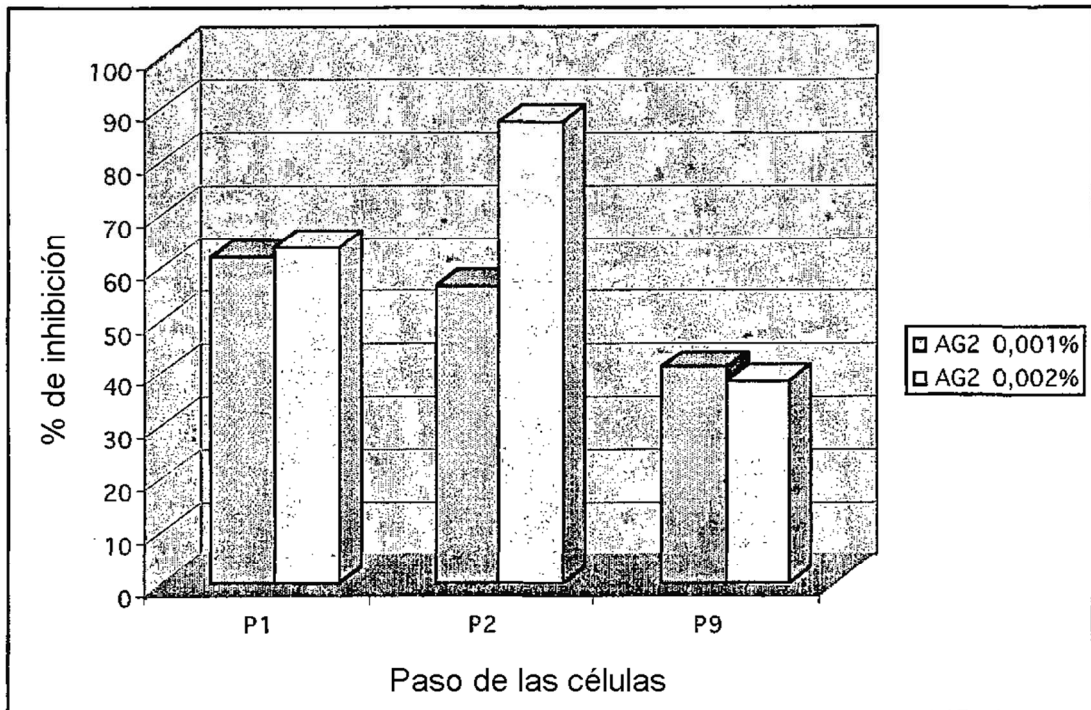


Figura 2

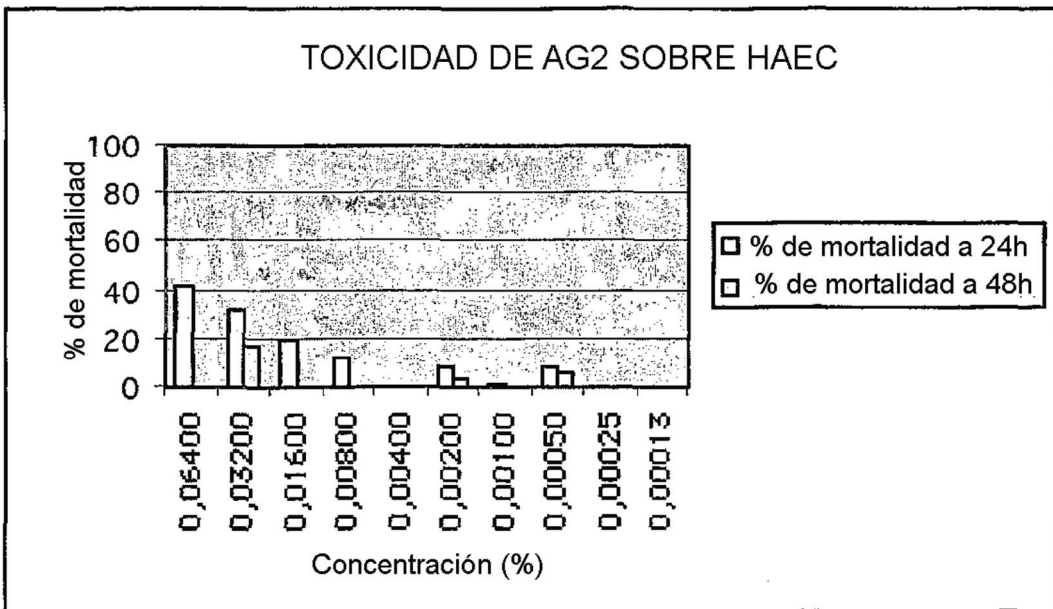
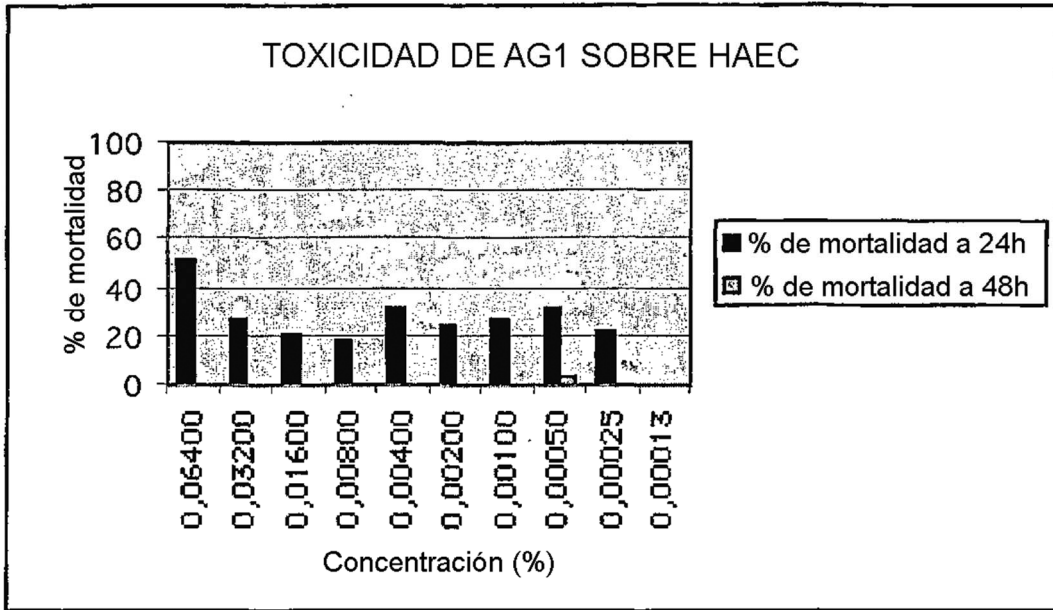


Figura 3A

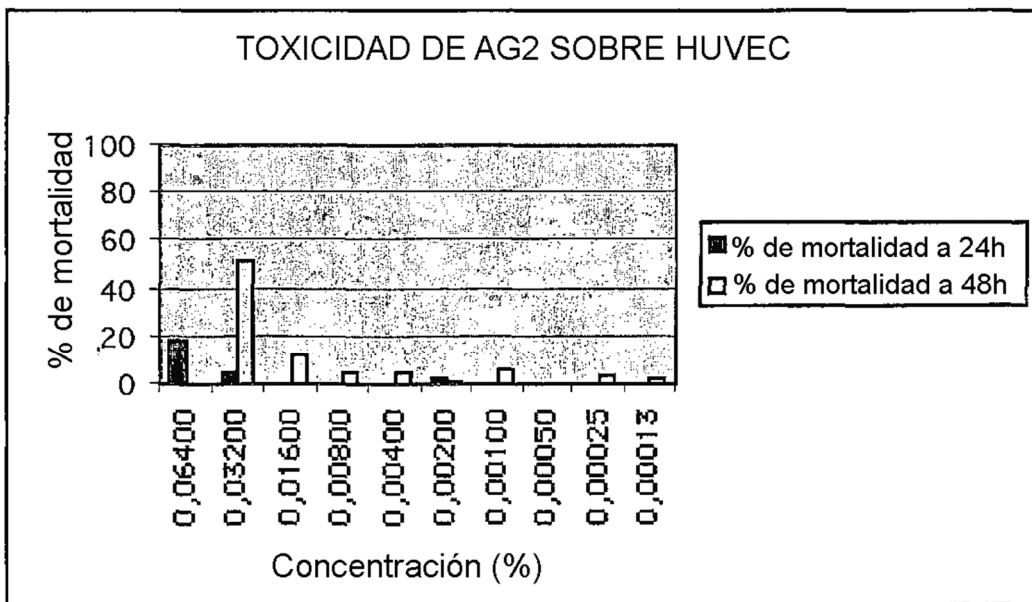
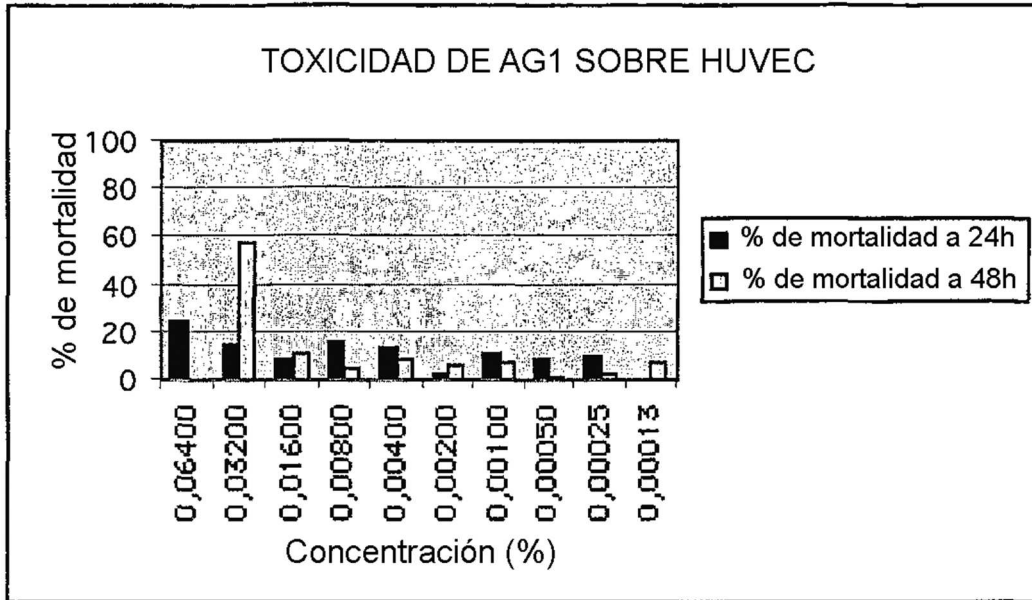


Figura 3B

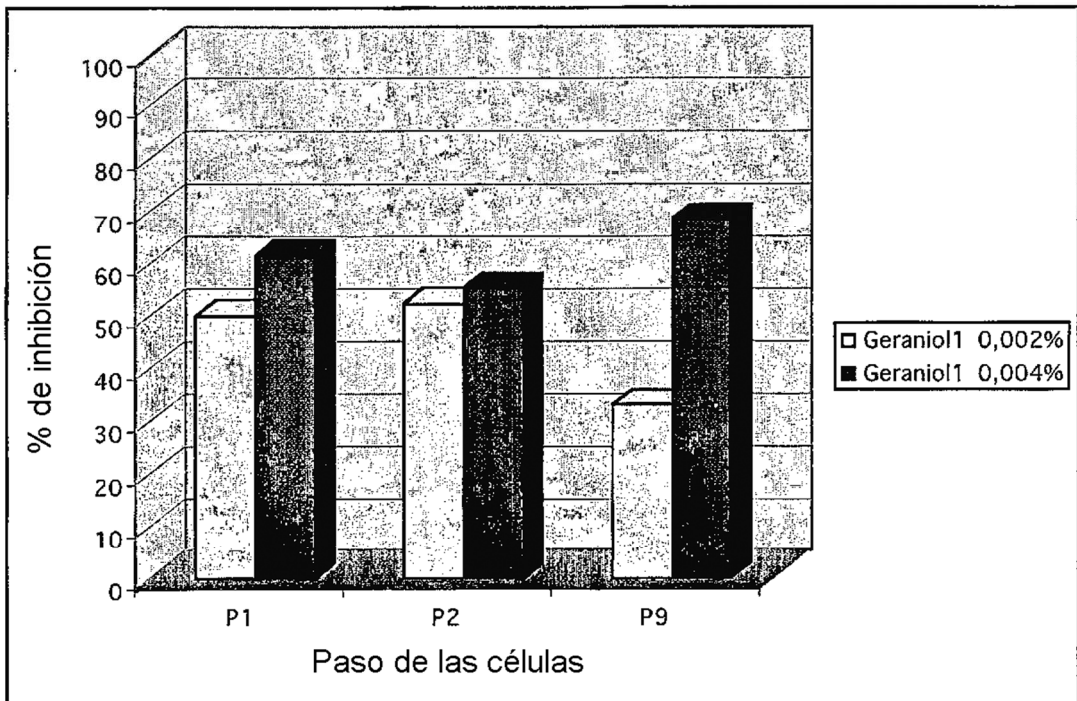


Figura 4

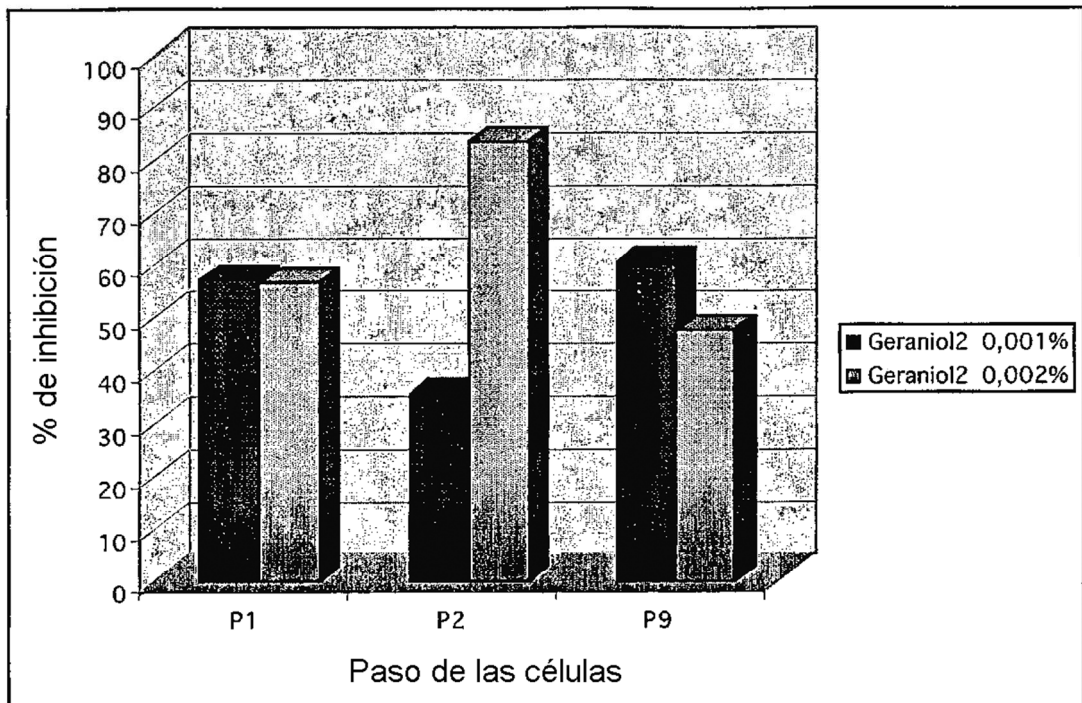


Figura 5

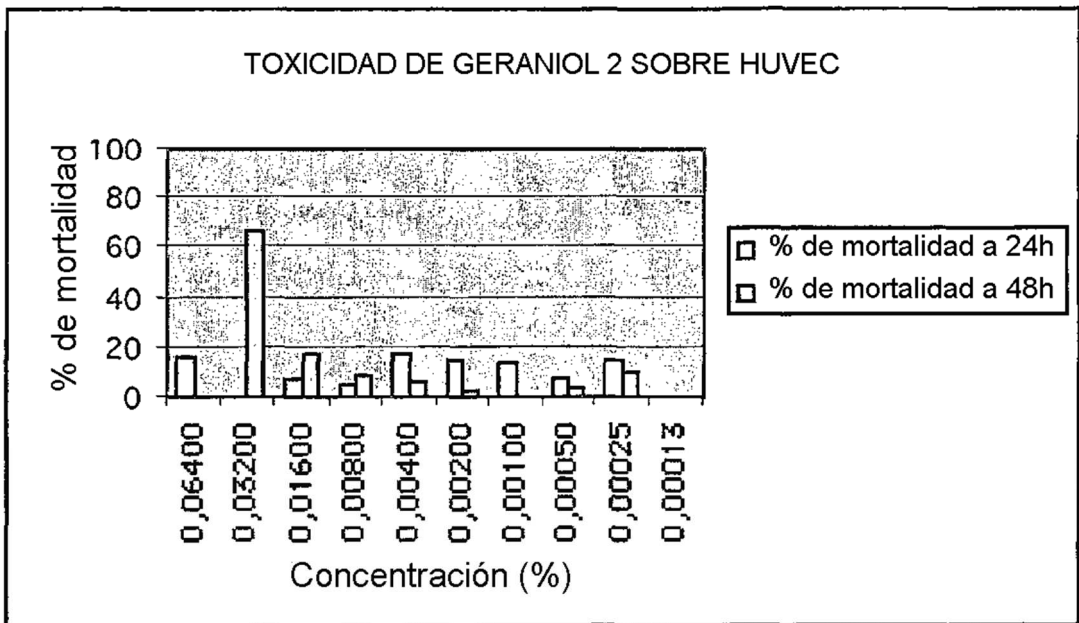
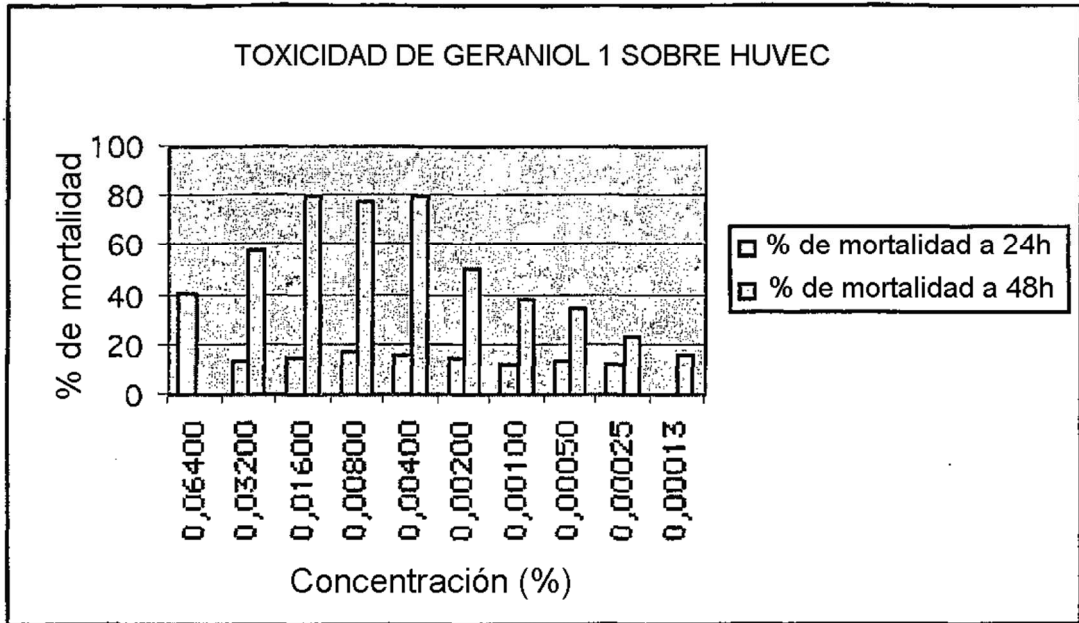


Figura 6A

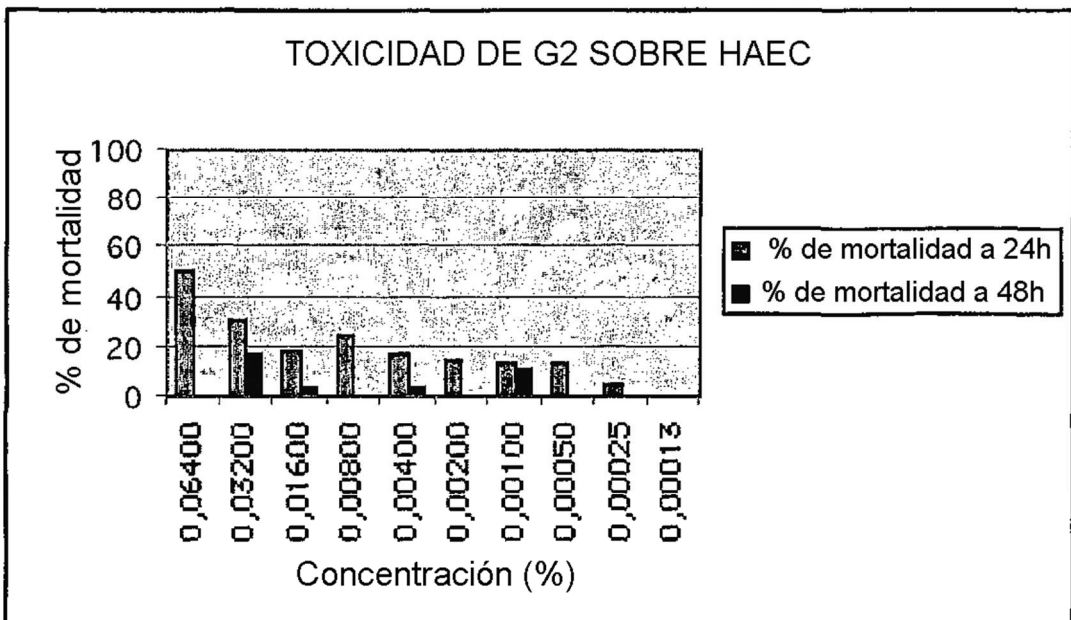
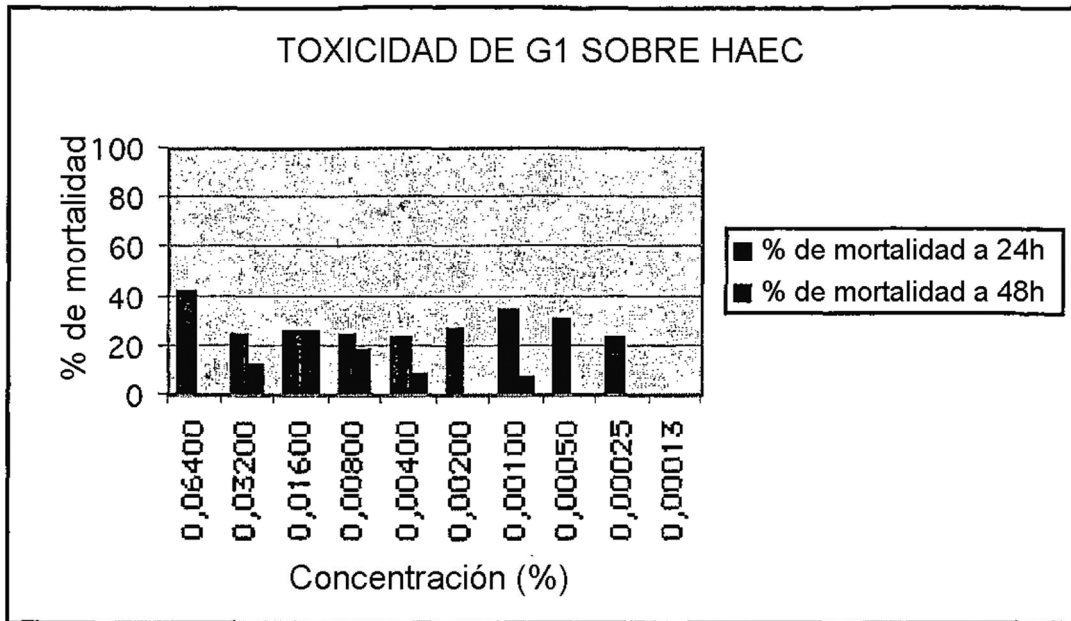


FIGURA 6B

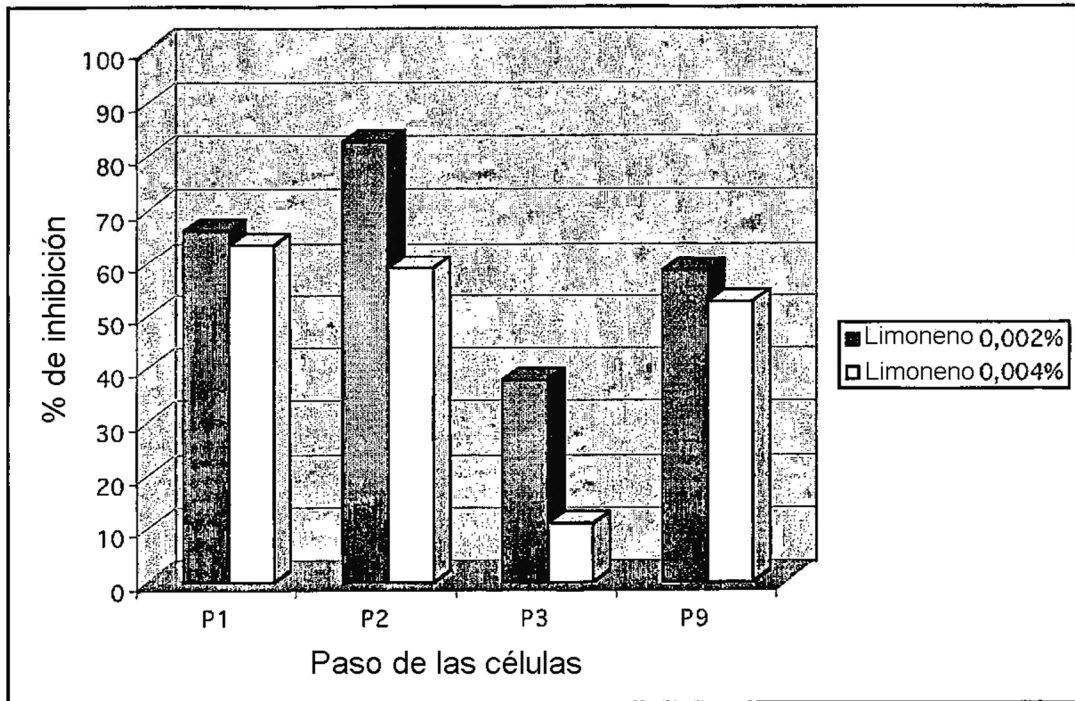


Figura 7

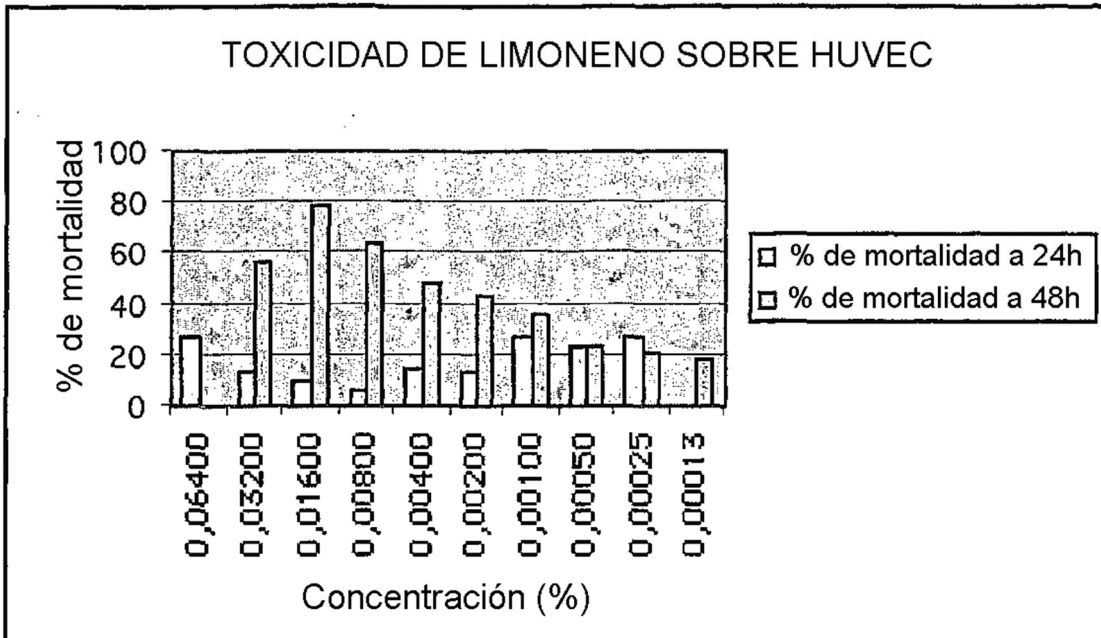


Figura 8A

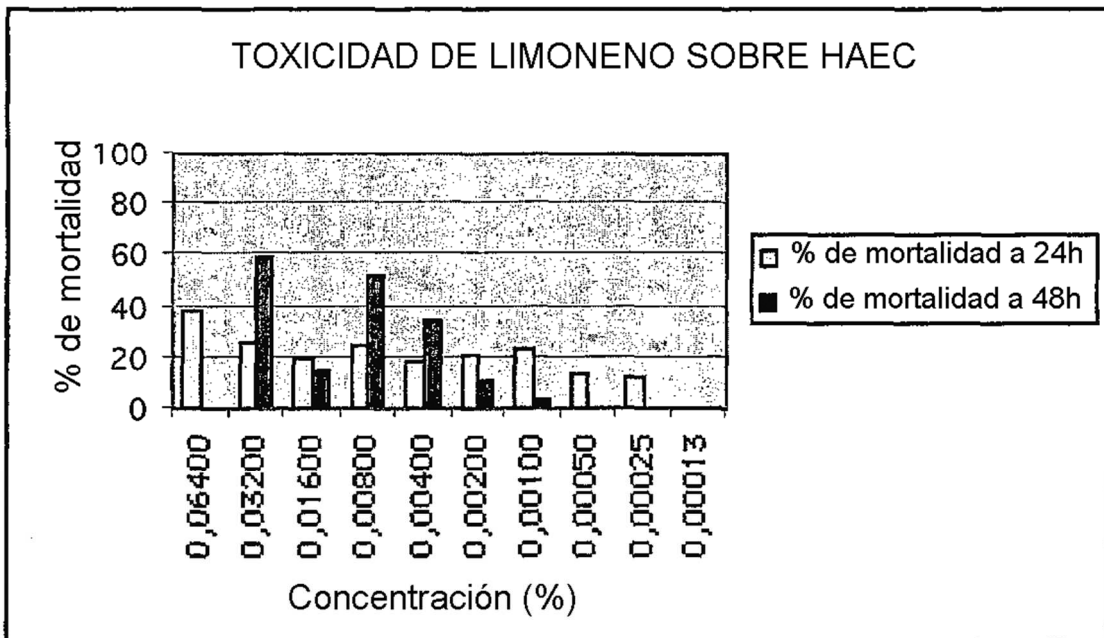


Figura 8B

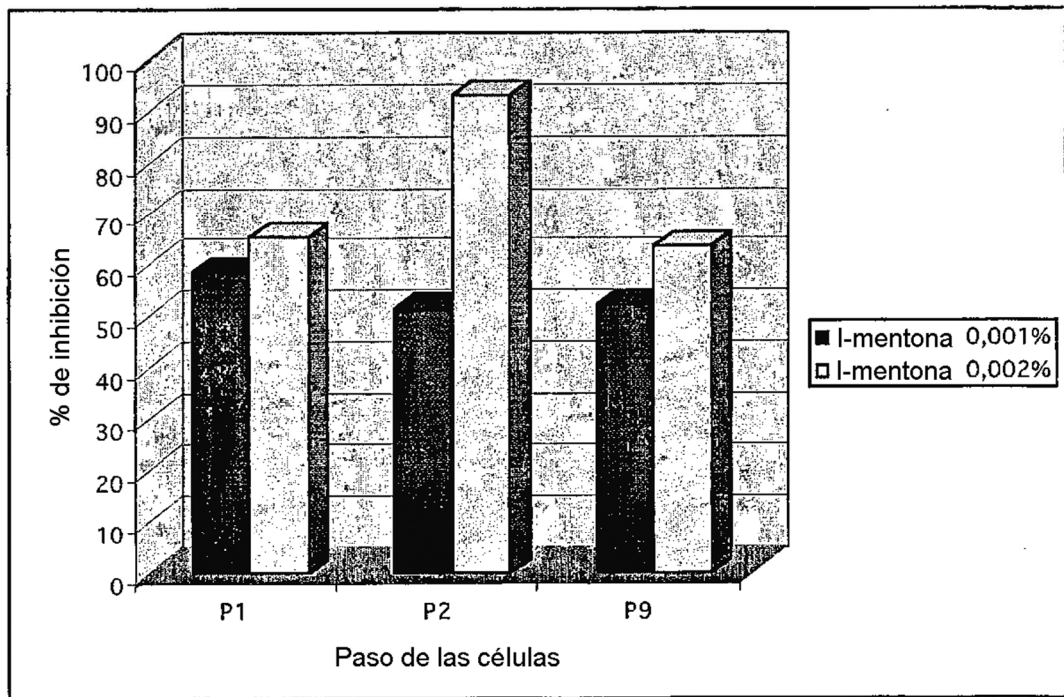


Figura 9

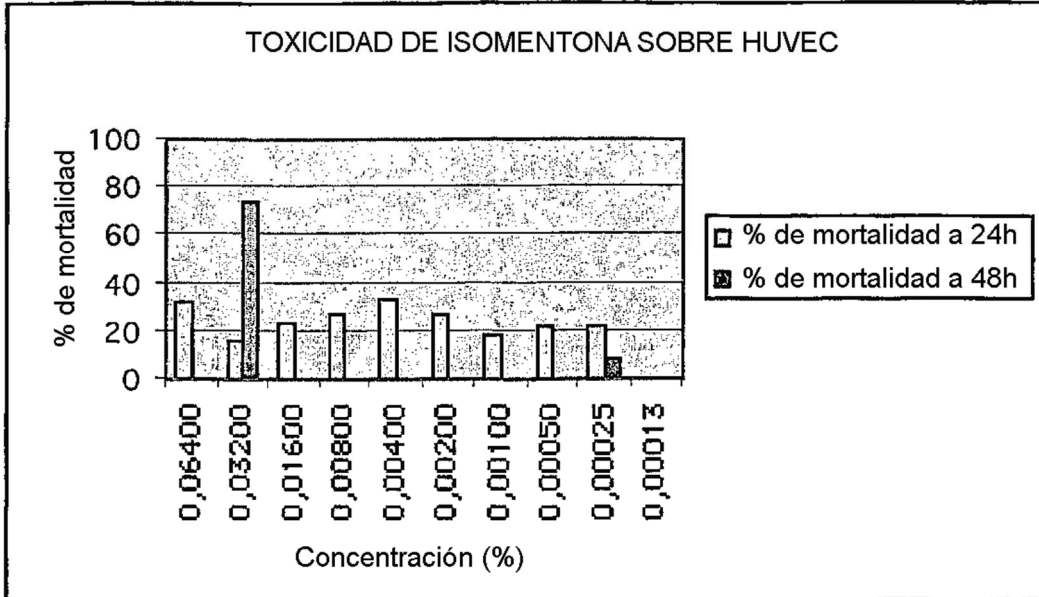


FIGURA 10A

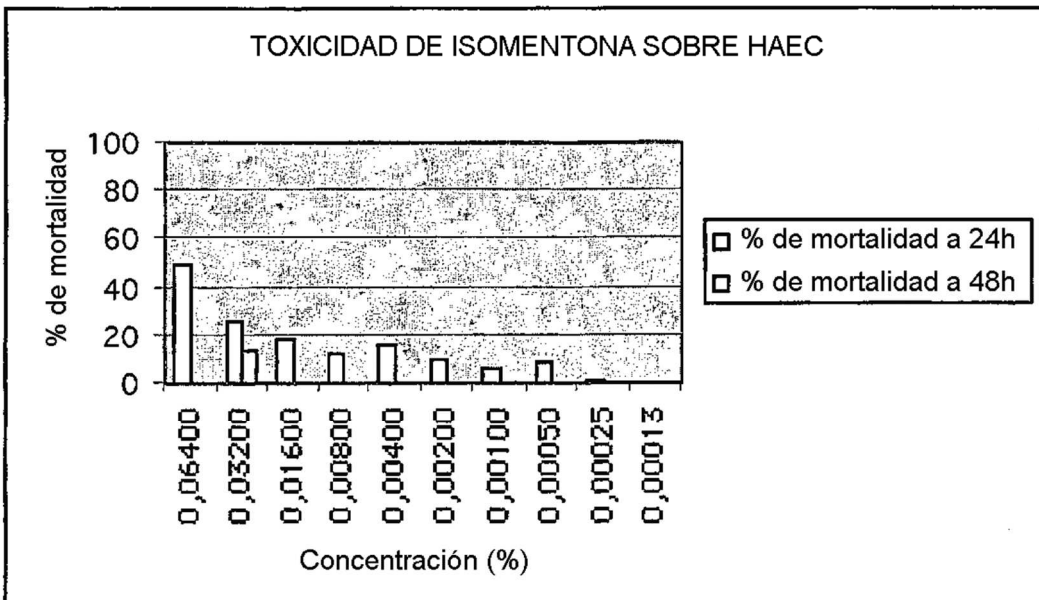
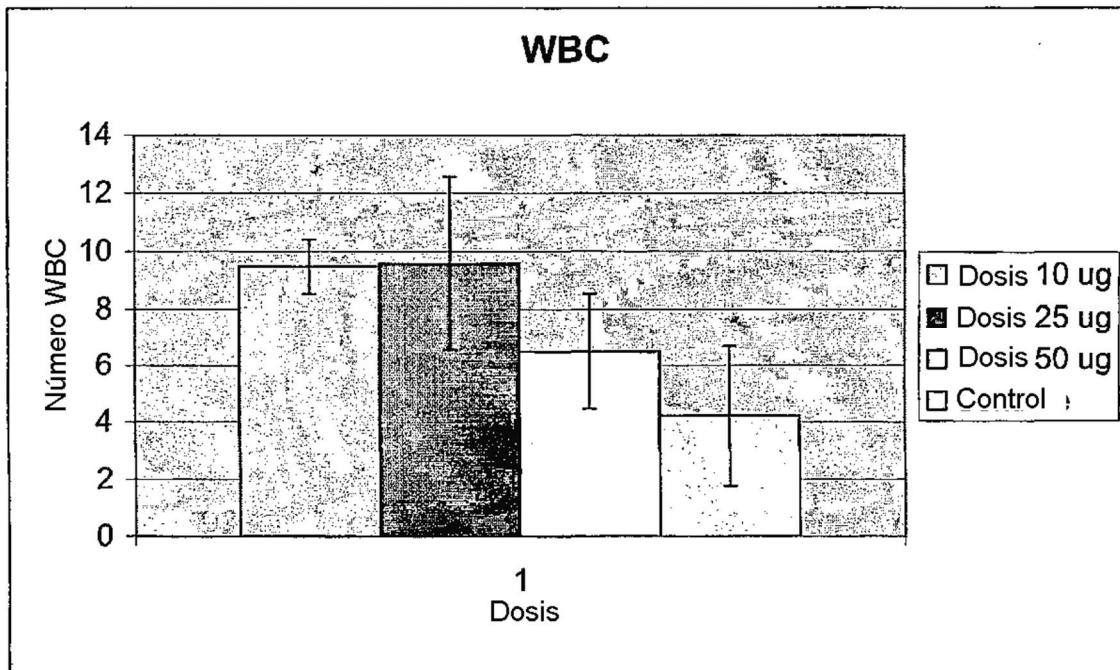


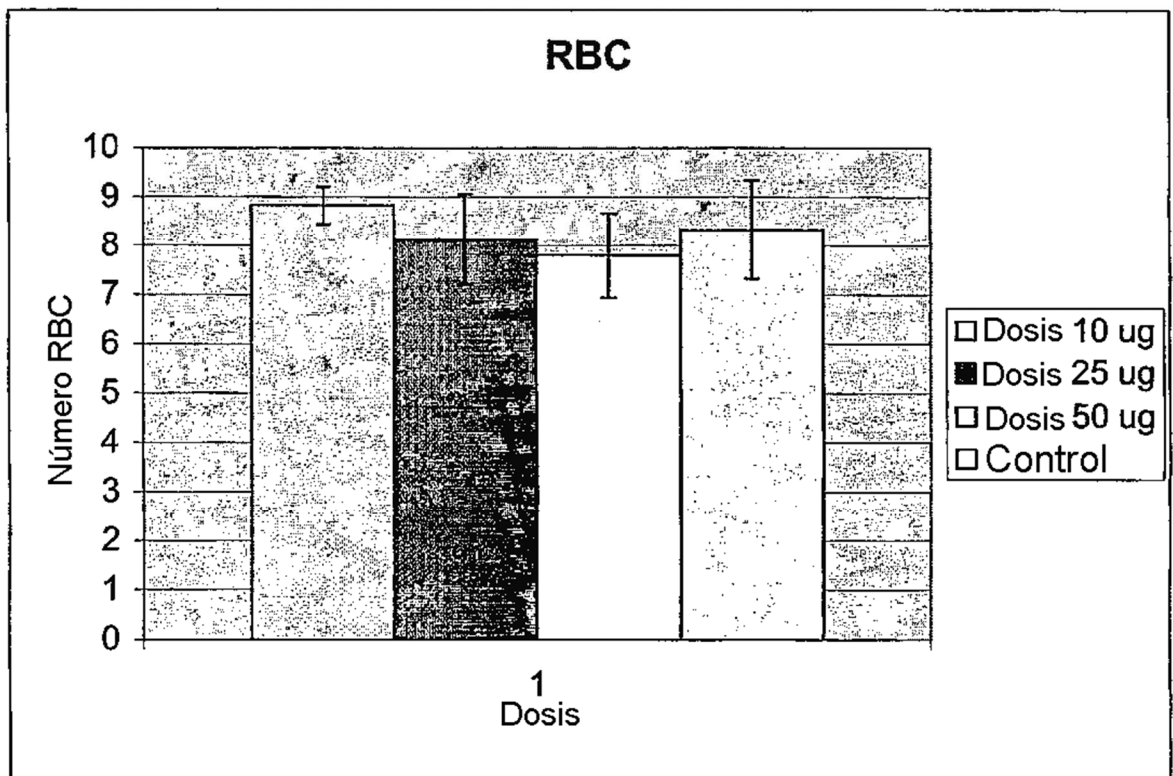
FIGURA 10B



	Media	Desviación estándar
Dosis 10 μ g	9,47	0,94
Dosis 25 μ g	9,56	3
Dosis 50 μ g	6,49	2,03
Media Ctrl	4,25	3,17

Intervalo de valores WBC 1,8-10,2 según Jackson Laboratories

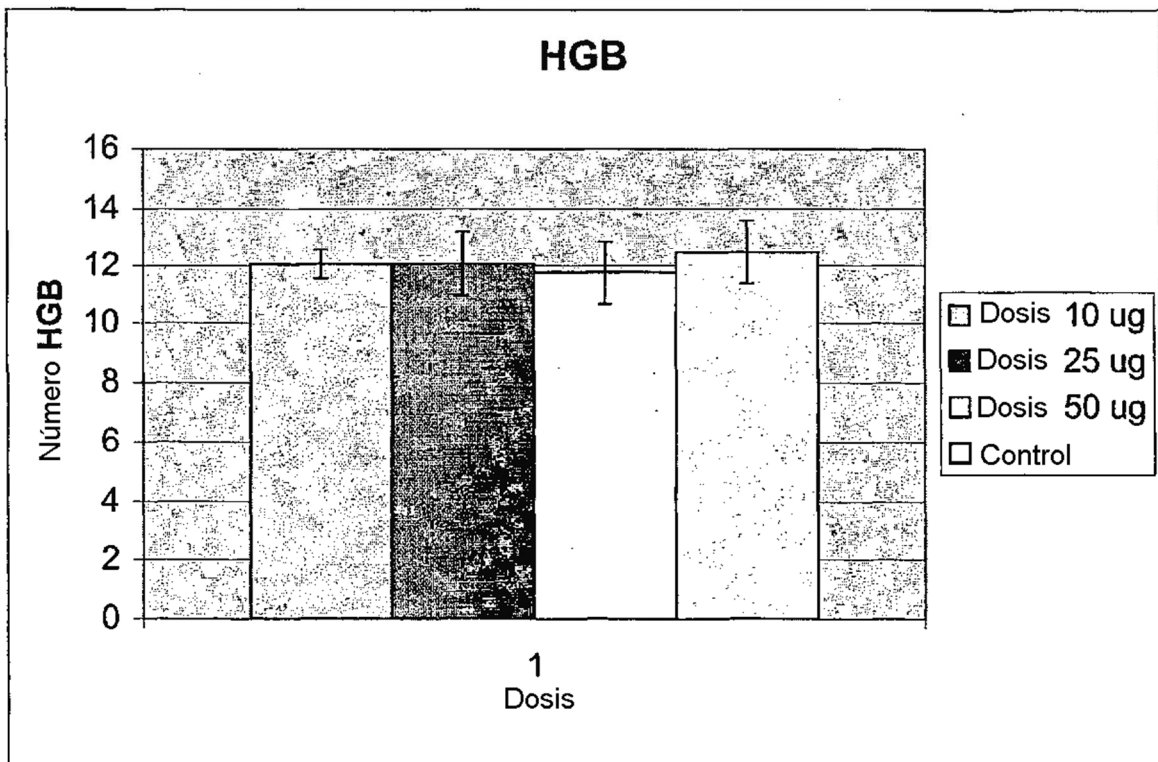
Figura 11



	Media	Desviación estándar
Dosis 10 µg	8,83	0,36
Dosis 25 µg	8,12	1,03
Dosis 50 µg	7,8	0,92
Media Ctrl	8,33	1,15

Intervalo de valores RBC 9-10,2 según Jackson Laboratories

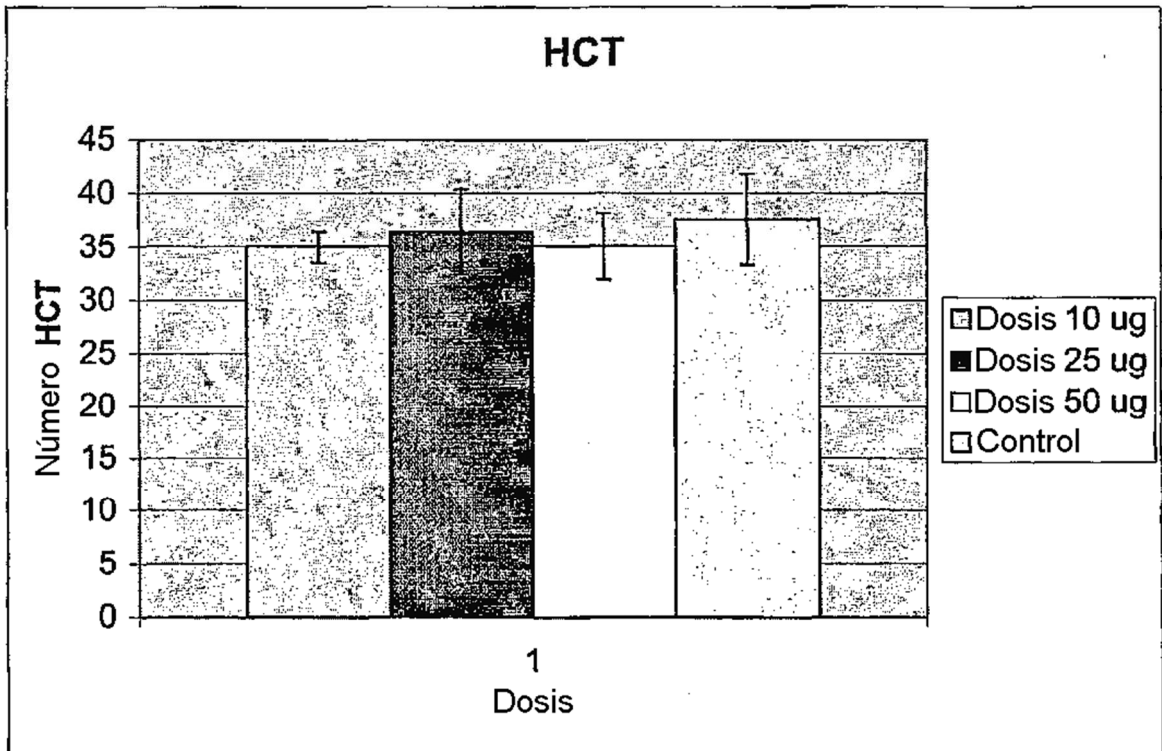
Figura 12



	Media	Desviación estándar
Dosis 10 µg	13,47	0,38
Dosis 25 µg	12,06	1,27
Dosis 50 µg	11,76	1,18
Media Ctrl	12,53	1,42

Intervalo de valores HGB 13,5 - 15,6 según Jackson Laboratories

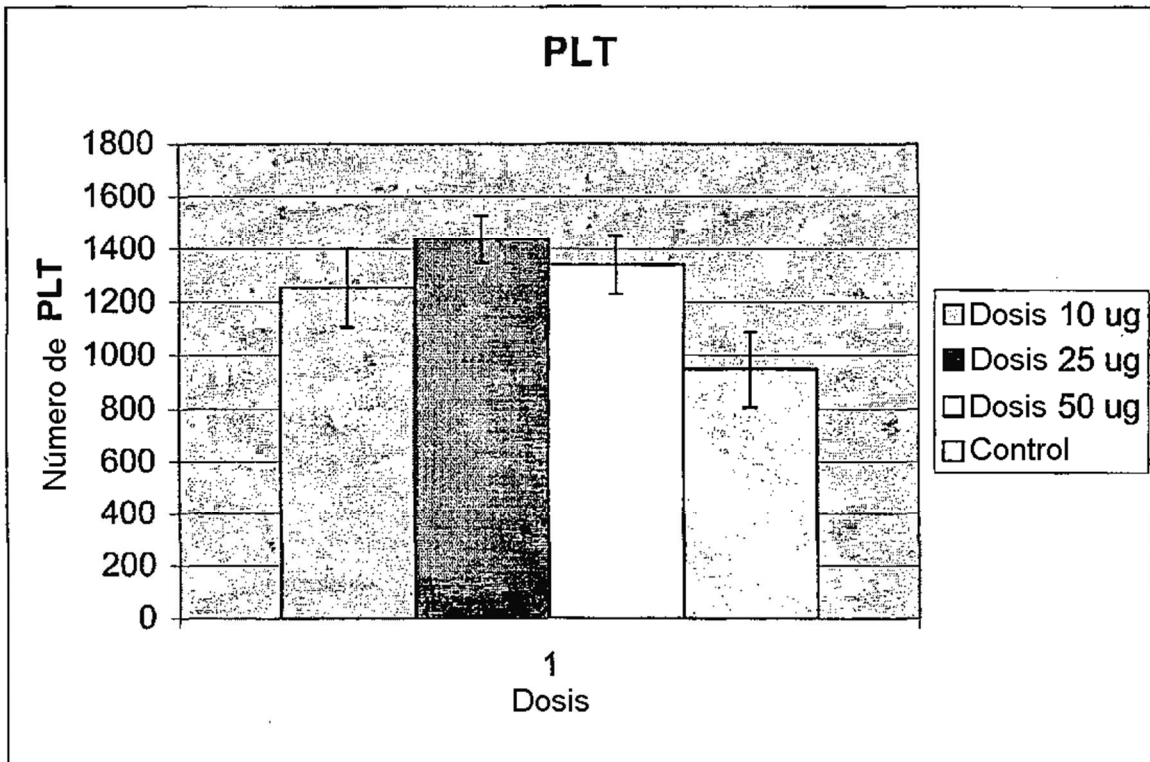
Figura 13



	Media	Desviación estándar
Dosis 10µg	40,05	1,26
Dosis 25µg	36,46	4,38
Dosis 50µg	35,06	3,27
Media Ctrl	37,6	4,89

Intervalo de valores HCT 44,1-48,4 según Jackson Laboratories

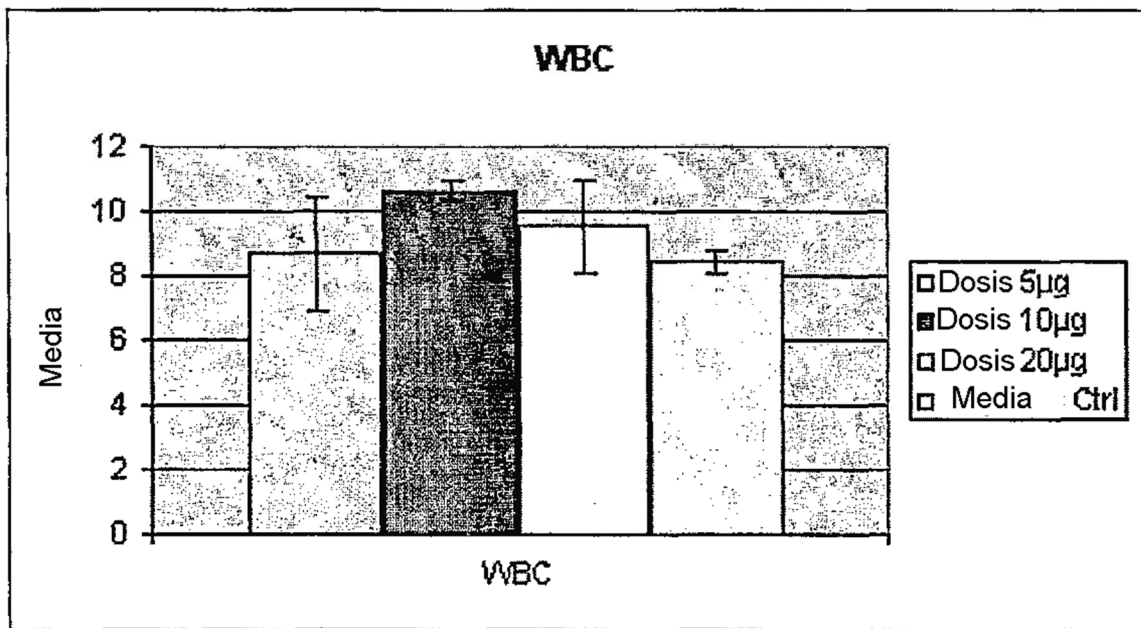
Figura 14



	Media	Desviación estándar
Dosis 10 µg	1254,25	147,28
Dosis 25 µg	1438	91,29
Dosis 50 µg	1340	111,18
Media Ctrl	948,66	140,97

Intervalo de valores PLAQUETAS 1178-1374 según Jackson Laboratories

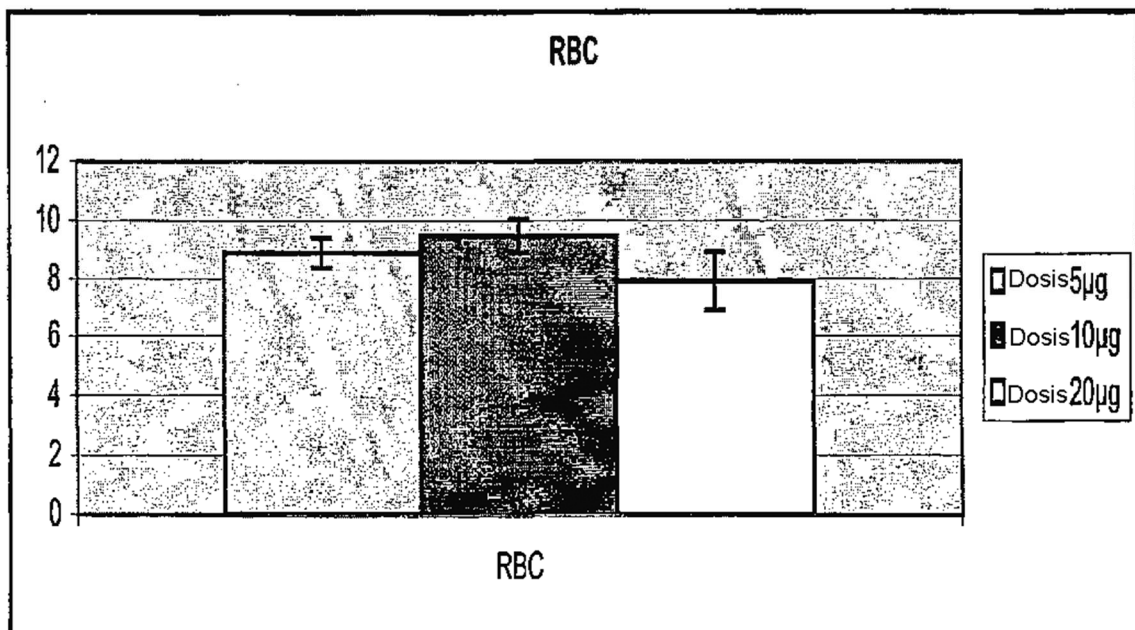
Figura 15



	Media	Desviación estándar
Dosis 5 µg	8,65	1,77
Dosis 10 µg	10,65	0,3
Dosis 20 µg	9,53	1,4
Media Ctrl	8,44	0,38

Intervalo de valores WBC 1,8 - 10,2 según Jackson Laboratories

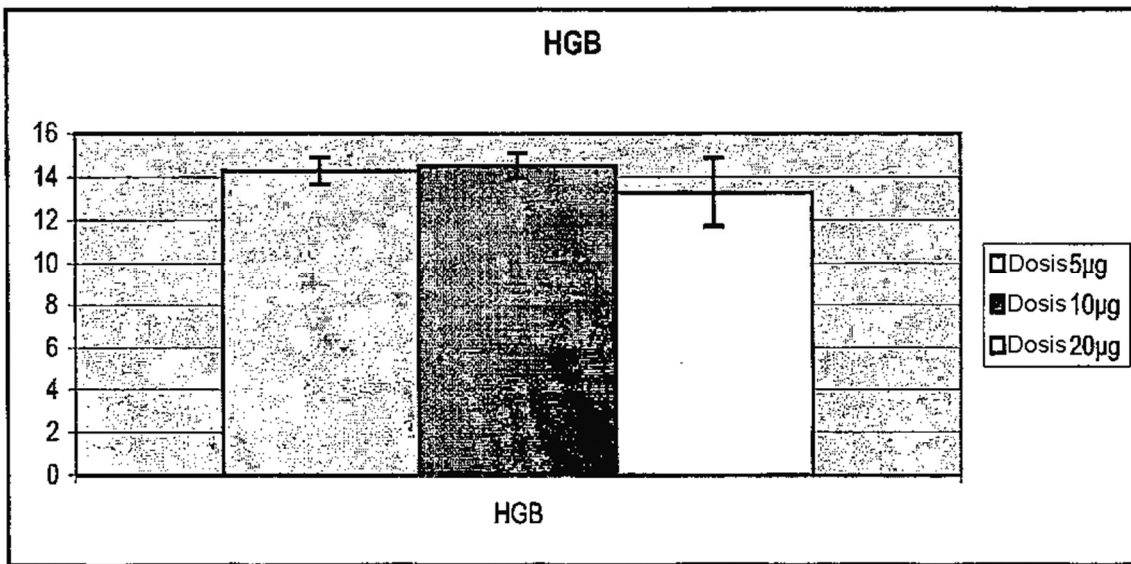
Figura 16



Dosis	Media	Desviación estándar
Dosis 5µg	8,91	0,52
Dosis 10µg	9,48	0,58
Dosis 20µg	7,92	1,00

Intervalo de valores RBC 9-10,2 según Jackson Laboratories

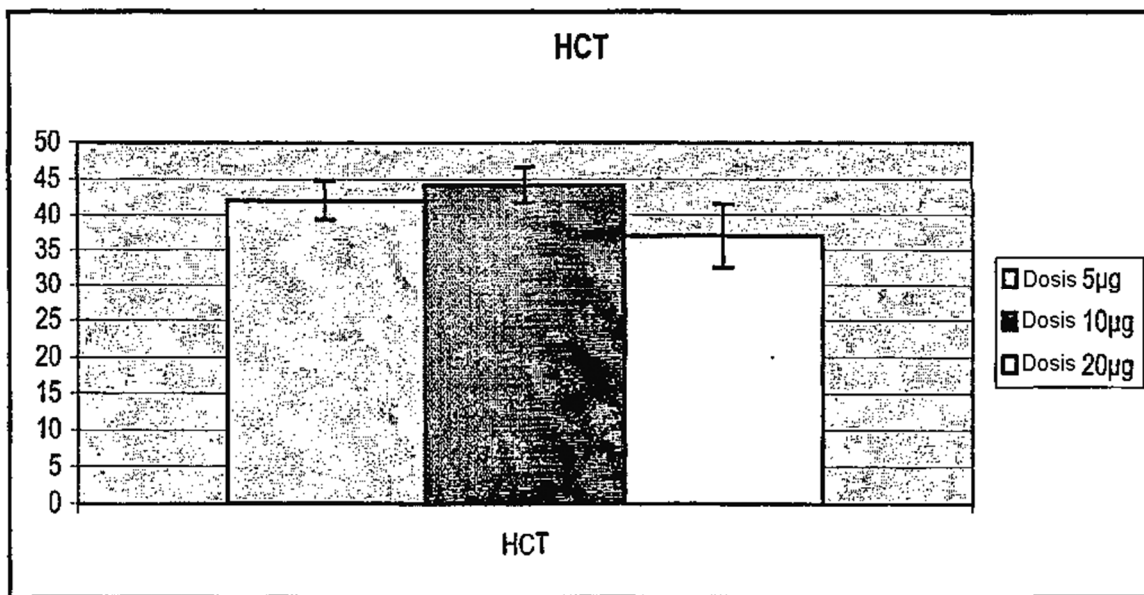
Figura 17



	HGB	
	Media	Desviación estándar
Dosis 5 µg	14,32	0,61
Dosis 10 µg	14,55	0,56
Dosis 20 µg	13,32	1,60

Intervalo de valores HGB 13,5 - 15,6 según Jackson Laboratories

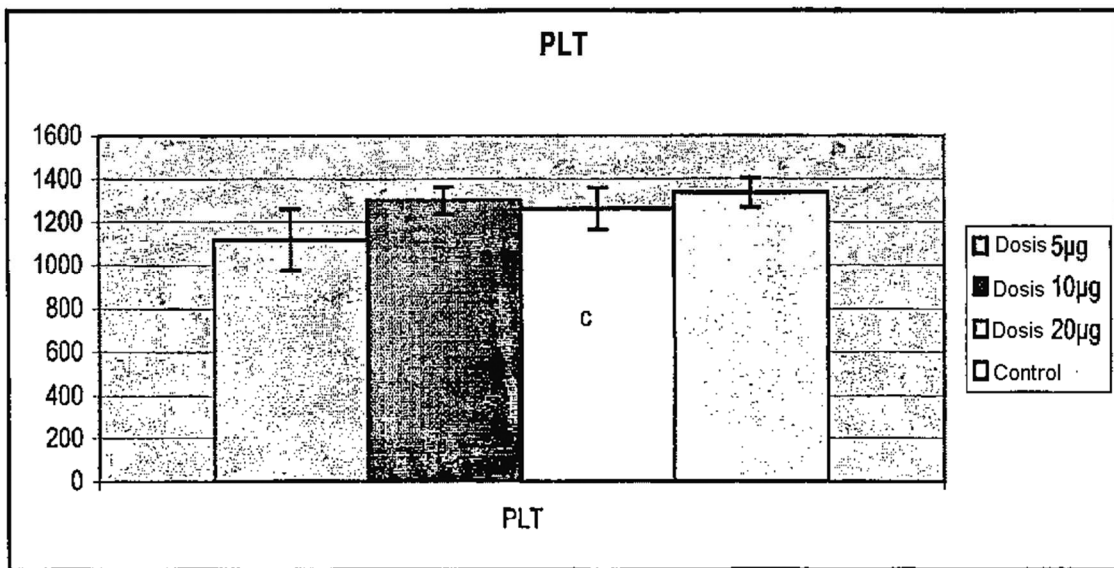
Figura 18



	HCT	
	Media	Desviación estándar
Dosis 5 µg	42,12	2,78
Dosis 10 µg	44,25	2,49
Dosis 20 µg	37,06	4,51

Intervalo de valores HCT 44,1-48,4 según Jackson Laboratories

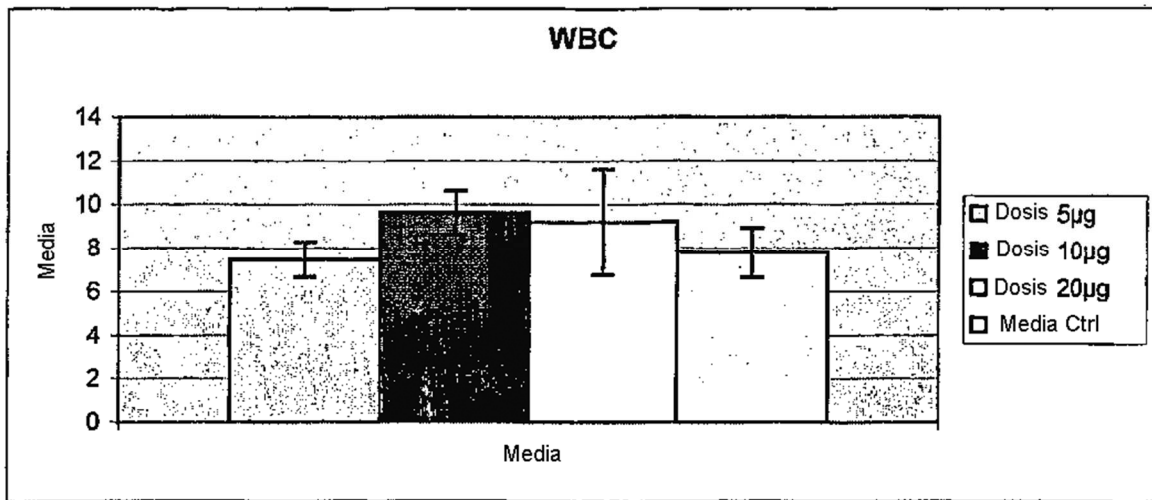
Figura 19



	PLT	Desviación estándar
Dosis 5 µg	Media 1121,25	142,80
Dosis 10 µg	1300,00	62,05
Dosis 20 µg	1263,66	95,84
Control	1336,75	67,66

Intervalo de valores PLAQUETAS 1178-1374 según Jackson Laboratories

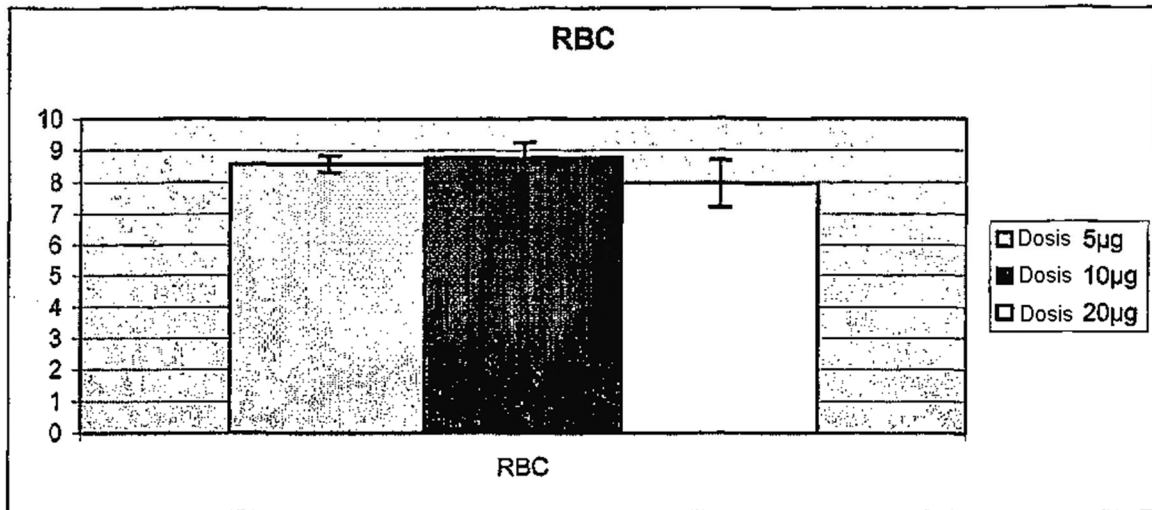
Figura 20



	Media	Desviación estándar
Dosis 5 µg	8,65	1,77
Dosis 10 µg	10,65	0,3
Dosis 20 µg	9,53	1,41
Media Ctrl	8,44	0,38

Intervalo de valores WBC 1,8 - 10,2 según Jackson Laboratories

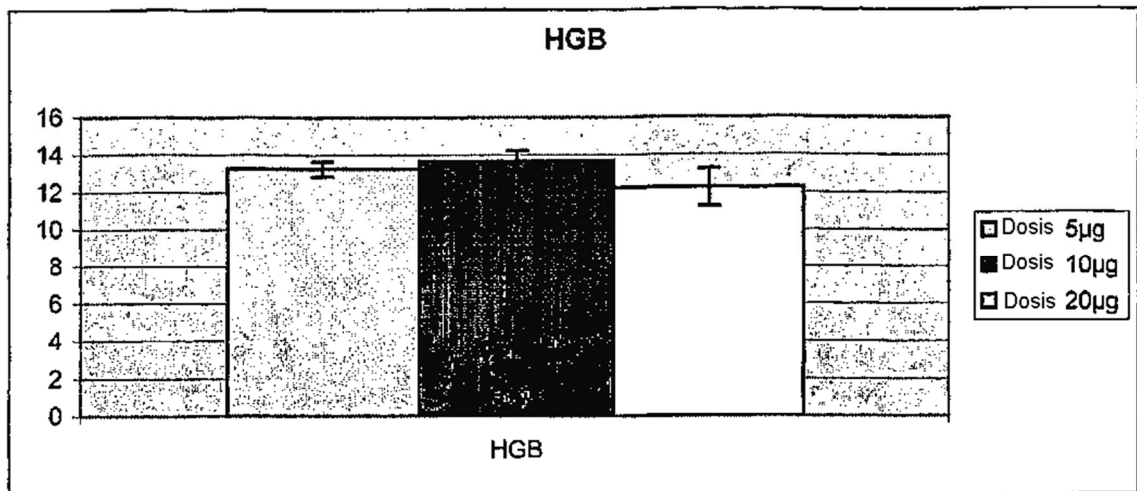
Figura 21



	Media	Desviación estándar
Dosis 5 µg	8,91	0,52
Dosis 10 µg	9,48	0,58
Dosis 20 µg	7,92	1,00

Intervalo de valores RBC 9-10,2 según Jackson Laboratories

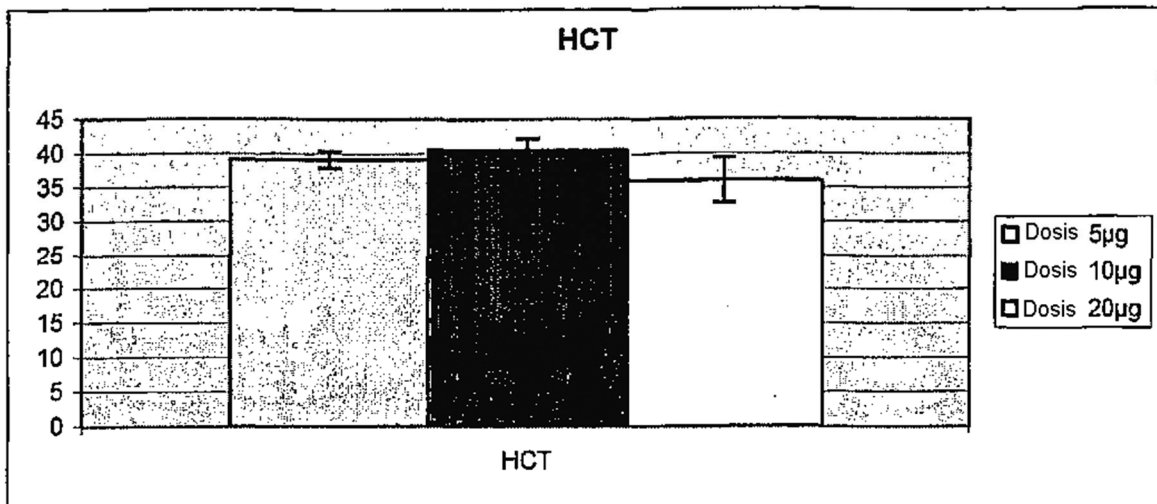
Figura 22



Dosis	Media	Desviación estándar
Dosis 5 µg	14,32	0,61
Dosis 10 µg	14,55	0,56
Dosis 20 µg	13,325	1,60

Intervalo de valores HGB 13,5 - 15,6 según Jackson Laboratories

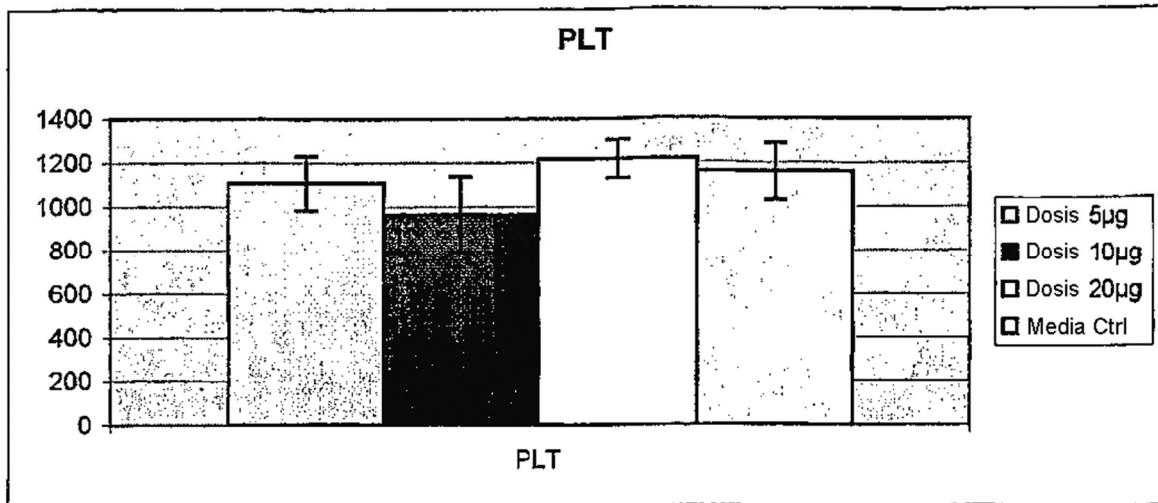
Figura 23



	Media	Desviación estándar
Dosis 5 µg	39,12	1,20
Dosis 10 µg	40,5	1,61
Dosis 20 µg	36,02	3,25

Intervalo de valores HCT 44,1-48,4 según Jackson Laboratories

Figura 24



	Media	Desviación estándar
Dosis 5 µg	1107,8	122,43
Dosis 10 µg	967	171,84
Dosis 20 µg	1214,8	88,85
Media Ctrl	1159,75	127,33

Intervalo de valores PLAQUETAS 1178-1374 según Jackson Laboratories

Figura 25