

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 540**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2009 E 09781039 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2323674**

54 Título: **Fracción de glicolípido procedente de cianobacterias para el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral**

30 Prioridad:

25.07.2008 IT MI20081370

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

27.08.2014

73 Titular/es:

**BLUEGREEN BIOTECH S.R.L. (100.0%)
Via Massena 15
20145 Milano, IT**

72 Inventor/es:

MOLTENI, MONICA

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 488 540 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

Fracción de glicolípido procedente de cianobacterias para el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral.

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere al campo de coadyuvantes para la higiene oral y el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral.

10 **Estado de la técnica**

[0002] La periodontitis es una enfermedad oral causada por algunas especies de bacterias gram-negativas. Es una enfermedad inflamatoria crónica del tejido oral, caracterizada por infecciones bacterianas crónicas que provocan la destrucción irreversible del tejido que soporta los dientes. Esta es una enfermedad muy común que afecta a aproximadamente a 3/4 partes de la población adulta con diversos grados de gravedad (1). El tejido subgingival se caracteriza por la presencia de muchas especies bacterianas, pero pocas de ellas son responsables del inicio y la progresión de la periodontitis. Estas son 4 especies de bacterias gram-negativas (*Actinobacillum actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*), anaerobios facultativos u obligados, que producen varios factores que les permiten colonizar la región de subgingival, para resistir el sistema inmune del huésped y causar la destrucción tisular (2-4). Sin embargo, entre estas, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) es la bacteria que se asocia con más frecuencia a la periodontitis avanzada. La incidencia y el grado de progresión de la enfermedad periodontal implican interacciones complejas entre las bacterias periodontopáticas y el sistema inmune del huésped. Se ha demostrado que la activación de las células inmunitarias del huésped por estas bacterias y sus productos conduce a la secreción de varios mediadores proinflamatorios, tales como citocinas y metaloproteinasas de matriz (MMP), que modulan la destrucción del tejido periodontal y también inducen la osteoclastogénesis (2). El lipopolisacárido (LPS) presente en la pared celular de las bacterias gram-negativas es el factor principal que puede desencadenar la liberación de mediadores proinflamatorios por las células inmunes que residen en la mucosa oral o se reclutan durante el proceso de infección, tales como los monocitos, macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y células dendríticas (4-6). El tratamiento profesional de la periodontitis se ha apoyado por el uso de adyuvantes para la higiene oral, tales como pasta de dientes y enjuague bucal, que contienen preferiblemente desinfectantes o agentes antibacterianos de amplio espectro, tales como triclosán, clorhexidina o, en algunos casos, antibióticos. Sin embargo, de acuerdo con los estudios más recientes, el uso de desinfectantes y/o agentes antibacterianos de este tipo no es totalmente recomendable por varios motivos, siendo el primero sin duda la aparente toxicidad celular de algunos compuestos, tal como el triclosán. Esta es una razón de por qué su uso incluso se ha prohibido en algunos países de la Comunidad Europea, y siendo el segundo que el LPS (o moléculas similares a LPS), el principal estímulo proinflamatorio, no es inactiva por la actividad germicida comúnmente presente en el enjuague bucal y/o la pasta de dientes; entonces su efecto como estímulo proinflamatorio se mantiene incluso después de la erradicación de la infección bacteriana. La tercera razón es que la actividad antimicrobiana de amplio espectro tiene el efecto secundario no deseado de eliminar también la flora microbiana "útil" o "buena". No menos importante, por lo tanto, incluso el uso de agentes protectores normales para la higiene oral no elimina específicamente la actividad proinflamatoria. Por lo tanto, es altamente deseable en el campo dental el desarrollo de las preparaciones para la higiene oral que, además de eliminar el agente bacteriano, contribuyen a inhibir específicamente los estímulos proinflamatorios asociados.

45 **Resumen de la Invención**

[0003] La presente invención se refiere a la fracción de glicolípido procedente de *Oscillatoria Planktothrix sp.*, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad bacteriana de las encías en la que la contaminación por proteínas es menor del 2% y la contaminación por ácidos nucleicos es menor del 5%. La etiología de la enfermedad de las encías se debe preferiblemente a una infección causada por una bacteria anaerobia seleccionada entre el grupo que comprende: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e incluso preferiblemente *Porphyromonas gingivalis*. Las enfermedades de las encías son preferiblemente gingivitis y periodontitis (piorrea). Un objeto adicional de la invención son composiciones dentales que comprenden la fracción de glicolípido que se ha mencionado anteriormente, preferiblemente en cantidades que varían entre 0,1 y 100 µg/ml, incluyendo, como ingredientes y/o diluyentes y/o estabilizadores y/o aditivos, compuestos adecuados para la administración oral, y opcionalmente uno o más principios activos diferentes. Preferiblemente, la concentración de la fracción activa está entre 1 y 50 µg/ml, preferiblemente 4-20 µg/ml para una pasta o gel, y 1-5 µg/ml para un enjuague bucal. Otro objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de *Oscillatoria Planktothrix sp.* de una fracción de glicolípido adecuada para su uso oral.

60

Breve descripción de las figuras

[0004] Figura 1. Inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias en presencia de extracto de cianobacterias (CE) (20 µg/ml) añadido simultáneamente 30, 60, 120, 240 minutos después de LPS procedente de *P. gingivalis*. Panel A: TNF-α; panel B: IL-6; panel C: IL-8; panel C: IL-1β.

5 Descripción detallada de la invención

[0005] Recientemente, se ha demostrado que un extracto de glicolípido preparado a partir de la cianobacteria *Oscillatoria Planktothrix FP1* es capaz de antagonizar en células dendríticas humanas los efectos proinflamatorios desencadenados por los antagonistas de LPS del receptor TLR4, tal como el LPS procedente de *E. coli* y *S. abortus equi* (10). La presente invención surge de una observación adicional de que el extracto también antagoniza los efectos proinflamatorios de un LPS procedente de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). *P. gingivalis* es la bacteria más común que está relacionada con la periodontitis o la periodontitis crónica, la cual se ha demostrado que es el agente causante principal. En particular, la respuesta proinflamatoria está relacionada con la presencia de sus componentes LPS y Fim 1, purificados como se describe en (9). Estos componentes se consideran actualmente como la causa principal de la destrucción del tejido periodontal asociada a una infección por *P. gingivalis*, que a menudo se asocia a la osteoclastogénesis (aumento del número de osteoclastos responsables de la destrucción del tejido óseo) y la infección crónica. El hallazgo de la presente invención es especialmente sorprendente en vista de la actividad que se ha demostrado previamente hacia LPS de *E. coli* y *S. abortus equi* puesto que el LPS procedente de *P. gingivalis* ejerce su actividad a través de la interacción con el receptor TLR2 (7-9), mientras que muchos LPS bacterianos activan las células de la inmunidad innata a través de la interacción con el receptor de membrana TLR4 que pertenece a la familia de receptores tipo Toll (TLR). Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a la fracción de glicolípido de *Oscillatoria Planktothrix sp.*, cuyo aislamiento y las condiciones de crecimiento se describen en (12) para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad de las encías y la periodontitis bacteriana.

[0006] Los estudios *in vitro* en líneas celulares monocíticas humanas han demostrado que la fracción de glicolípido procedente de *Oscillator Planktothrix sp.* es capaz de antagonizar principalmente los efectos proinflamatorios (es decir, la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias) inducidos por LPS de *P. gingivalis*. Por lo tanto, ésta representa un buen candidato para combatir la inflamación gingival (gingivitis) y afecciones de inflamación leve y grave de los alvéolos dentarios (periodontitis o piorrea), la destrucción del tejido periodontal asociada a una infección crónica y los fenómenos más graves de osteoclastogénesis que se encuentran con la misma frecuencia en estas infecciones. Los estudios *in vitro* también han demostrado que los extractos cianobacterianos preparados de acuerdo con la invención, que muestran un nivel de contaminación por proteínas inferior al 2% y un nivel de contaminación por ácidos nucleicos inferior al 5%, no son citotóxicos para las células de mamíferos como se evaluó en los ensayos citotóxicos en líneas celulares, así como en PBMC aisladas de sangre humana. Por lo tanto, es posible reivindicar su uso para el tratamiento de la cavidad oral, tanto en forma de una composición para el tratamiento profesional de enfermedades gingivales, particularmente, piorrea y periodontitis, como en forma de una composición que se usará como adyuvante para la higiene oral, tal como un enjuague bucal, gel, pasta o dispositivos que pueden masticarse o disolverse en la boca, por ejemplo, goma de mascar o caramelos. La falta de citotoxicidad del extracto de la invención se ha ensayado en sistemas celulares *in vitro* hasta una concentración (100 µg/ml) que es 100 veces mayor que la concentración eficaz mínima. El extracto de la invención, preparado como se describe a continuación, es inodoro, incoloro e insípido: por lo tanto, es posible su uso en preparaciones alimenticias que pueden masticarse o disolverse en la cavidad oral, por ejemplo, en forma de píldoras revestidas de azúcar, goma de mascar, caramelos o píldoras (también en combinación con otras sustancias activas, por ejemplo xilitol) si se combinan con otros ingredientes o componentes con las mismas características. Por lo tanto, las composiciones que contienen el extracto poseen las propiedades ventajosas de carencia de citotoxicidad, en las condiciones descritas, y cualidades organolépticas satisfactorias. Con el fin de mejorar las últimas, sin embargo, las composiciones pueden incluir agentes saporíferos y colorantes y edulcorantes, en pequeñas cantidades.

[0007] El extracto se prepara de forma conveniente en forma de una composición adecuada para administración oral y pueden prepararse en una forma más o menos concentrada como una preparación protectora para uso profesional en limpieza dental y para la prevención y tratamiento de piorrea, de gingivitis más grave y en general de la periodontitis, o simplemente como adyuvante para la higiene oral. Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden el extracto de glicolípido procedente de *Oscillator Planktothrix sp.*, preferiblemente en cantidades comprendidas entre 0,1 y 100 µg/ml, más preferiblemente en cantidades comprendidas entre 1 y 50 µg/ml, o incluso más preferiblemente comprendidas entre 4 y 20 µg/ml, en general, para preparaciones para el tratamiento dental profesional, y que varían de 1 a 5 µg/ml para preparaciones protectoras para la higiene oral. Además, en un aspecto preferido, estas composiciones comprenden excipientes, diluyentes y/o otros principios activos adecuados para su uso en la cavidad oral, tales como, por ejemplo: agentes bacteriostáticos o germicidas, por ejemplo, derivados de amonio cuaternario (tales como cloruro de cetilpiridinio o clorhexidina, o tensioactivos, detergentes, triclosán y compuestos similares, por ejemplo DDDE (2,2,-dihidroxi-5.5 dibromodifenil éter) y estabilizadores. Como agentes antibacterianos, también es posible usar antibióticos, tales como, por ejemplo, penicilina, eritromicina o tetraciclina, u

otros fármacos con actividad antibacteriana. Las composiciones de la invención también pueden comprender adyuvantes conocidos de higiene oral, tales como compuestos antisarro como polifosfatos, agentes anticaries como sales fluoruro (por ejemplo monofluorofosfato), compuestos antiplaca (tales como urea, lactato cálcico o similares), sales potásicas como agentes desensibilizantes (por ejemplo citrato potásico o similares).

[0008] El extracto de glicolípido puede diluirse tanto en agua como en un disolvente aprótico, tal como DMSO y es estable en una solución acuosa incluso cuando se combina, por ejemplo, con clorhexidina; además, también es estable al calor. En la formulación como colutorio, el extracto cianobacteriano está en solución acuosa o puede diluirse en agua, mientras que en las composiciones sólidas (pasta de dientes, gel, etc. caramelos o goma de mascar) puede contener agentes espesantes o gelificantes, tales como polisacáridos naturales o sintéticos (por ejemplo, carragenano, carboximetil celulosa, hidroximetil celulosa, dextrano, almidón, glicerina vegetal), sílice amorfa o dióxido de titanio, goma natural o sintética (por ejemplo goma arábica) polivinilpirrolidona, polietilenglicol o compuestos capaces de conferir características similares que se conocen bien por el experto en la técnica. Se describe un proceso para preparar la fracción de glicolípido procedente de un cultivo de *Oscillator Planktothrix sp.* por Yi y col. (11): La muestra se trata a temperatura ambiente, comprendida entre 18 °C y 30 °C, durante un corto tiempo de incubación de al menos 5 minutos, preferiblemente al menos 10 minutos, incluyendo etapas de purificación adicionales, tales como preparación de al menos la fracción de glicolípido en presencia de acetato sódico y acetona, después de la extracción con un reactivo a base de: un disolvente orgánico, preferiblemente fenol, un agente caotrópico (tal como tiocianato de guanidina) como Tri-reagent® (Sigma N° cat. T3934) o reactivos similares, tales como Trizol® (Invitrogen) y un segundo disolvente orgánico, tal como cloroformo, lavados posteriores con etanol al 70% y eliminación de contaminantes por proteínas mediante digestión con una proteinasa, por ejemplo la proteinasa K. Estos tratamientos adicionales permiten conseguir una mejor actividad específica ya que dan como resultado la eliminación de contaminantes, tales como fosfolípidos y proteínas heterólogas, que pueden tener un efecto estimulante sobre la producción de citocinas proinflamatorias, haciendo de esta manera que el extracto sea menos eficaz. Una concentración reducida de contaminantes permite usar concentraciones inferiores de extracto en bruto en la cavidad oral. Además, la precipitación con sal (por ejemplo acetato sódico) y un disolvente orgánico, tal como acetona, y lavados adicionales del gránulo con etanol diluido en agua, permiten eliminar trazas residuales de disolventes tóxicos requeridos para extraer este tipo de constituyentes celulares. El proceso para la preparación del extracto de *Oscillator Planktothrix sp.* proporciona una centrifugación del cultivo cianobacteriano que ha alcanzado la fase de crecimiento estacionaria, en medio tal como BG11 (Sigma-Aldrich N° cat. C3061), como se describe en Pomati y col. (12). El gránulo obtenido de este modo puede congelarse antes del proceso de extracción que implica, después de la descongelación:

- a) dilución del gránulo, preferiblemente con un volumen igual de agua o disolvente acuoso,
- b) mezcla con un volumen apropiado de una solución de extracción (desnaturalizante) descrita en (13), que consiste preferiblemente en un reactivo basado en un disolvente orgánico prótico polar, preferiblemente fenol, y un agente caotrópico (tal como tiocianato de guanidina) como Tri reagent® (Sigma N° cat. T3934), o reactivo similares, tales como Trizol® (Invitrogen) y un disolvente aprótico orgánico, tal como cloroformo, en una proporción de aproximadamente 1 volumen de suspensión acuosa de cianobacterias, 2-4 volúmenes de solución de extracción, preferiblemente aproximadamente 3, y cloroformo, aproximadamente 0,5-1 volumen;
- c) incubación de la mezcla durante al menos 5 minutos, más preferiblemente durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente;
- d) centrifugación, preferiblemente a aproximadamente 2000xg y recogida del sobrenadante (fase acuosa) que contiene la fracción de glicolípido, que puede medirse mediante ensayo bioquímico, por ejemplo, por electroforesis y tinción de plata, o mediante la inhibición del ensayo de citotoxicidad en presencia de LPS.

[0009] El lisado cianobacteriano obtenido en d), que es el gránulo obtenido por centrifugación, puede extraerse de nuevo opcionalmente para obtener la fracción de glicolípido añadiendo de nuevo agua o un tampón acuoso (en una cantidad aproximadamente igual a la cantidad eliminada) y centrifugando de nuevo la muestra. El segundo sobrenadante se agrupa con el sobrenadante previo y después se somete a las siguientes etapas adicionales:

- e) precipitación mediante adición de sal, por ejemplo acetato sódico (5-20 mM finales), y de un disolvente orgánico, preferiblemente acetona, en una cantidad igual a aproximadamente 2 volúmenes seguido de centrifugación en las mismas condiciones que anteriormente;
- f) lavado al menos una vez, preferiblemente dos veces, del gránulo obtenido por centrifugación con etanol diluido en agua, por ejemplo etanol al 70%, y resuspensión del gránulo en una solución acuosa, preferiblemente una solución acuosa tamponada, por ejemplo TRIS 50 mM,
- g) tratamiento enzimático de contaminantes por ácidos nucleicos con endo y exonucleasas (por ejemplo, ADNasa y ARNasa) y tratamiento posterior de los contaminantes por proteínas con una proteasa, por ejemplo la proteinasa K, preferiblemente en una cantidad igual a 100 µg/ml, durante un tiempo suficiente (al menos 1 hora a 37 °C). Después de la digestión enzimática, la muestra se centrifuga de nuevo, el

sobrenadante se recupera y se precipita adicionalmente mediante la adición de sal (por ejemplo acetato sódico, aproximadamente 10 mM finales) y de un volumen apropiado (preferiblemente 2 volúmenes) de acetona u otro disolvente orgánico. La muestra se centrifuga de nuevo, y el gránulo se suspende de nuevo en agua o en una solución acuosa y se somete un tamiz molecular usando un filtro (u otro dispositivo adecuado) con un corte de 30 kilodaltons, dando como resultado de este modo la eliminación de todo lo que pasa a través del filtro y que conduce a la recuperación de la fracción de lípido retenida, junto con agua o una solución acuosa tamponada.

[0010] La actividad de la fracción de glicolípido obtenida de este modo se mide mediante ensayos biológicos en base a la inhibición de la actividad proinflamatoria inducida por LPS (de *P. gingivalis* o *E. coli*) en células que producen citocinas, tales como IL-6, IL-8 TNF-alfa y/o IL-1 β , como por ejemplo, THP1, y/o mediante ensayos bioquímicos, como por ejemplo electroforesis.

[0011] Se entiende que el proceso que se ha descrito anteriormente puede modificarse por el experto en la técnica con pequeñas variaciones en, por ejemplo, las concentraciones y/o volúmenes finales y/o las condiciones de centrifugación, sin cambiar la actividad del producto final.

[0012] El proceso para la purificación de la fracción de glicolípido descrito en 10) incluye únicamente la etapa g) que se ha descrito anteriormente.

[0013] Las etapas que eliminan trazas de disolventes orgánicos, por ejemplo, fenol, y la retirada de la mayor parte de los contaminantes por proteínas son importantes para aplicaciones para la cavidad oral.

[0014] De hecho, el extracto de glicolípido obtenido como se ha descrito anteriormente muestra una contaminación por proteínas <2% y una contaminación por ácidos nucleicos <5%, de acuerdo con la medición de la primera por el método de Bradford para el ensayo de proteínas y de la última mediante una lectura espectrofotométrica a 260 nm para la determinación de ácidos nucleicos.

[0015] De acuerdo con un aspecto preferido, la invención se refiere a una fracción de glicolípido procedente de *Oscillatoria Planktothrix* sp. de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento para la prevención y tratamiento de una enfermedad de las encías, que varía de la forma más leve, tal como gingivitis, a las formas más graves, tal como periodontitis (piorrea) en todas sus fases respectivas, incluyendo además la forma crónica, en los sujetos afectados por estos trastornos. El procedimiento consiste en el tratamiento de la cavidad oral con una de las composiciones de la invención, aplicando pasta o geles al sitio de la infección o usando sistemáticamente las medidas protectoras para la higiene oral de acuerdo con la invención. Además, como se ha mencionado anteriormente, puesto que la actividad antiproinflamatoria de las composiciones de la invención se realiza después de la erradicación del agente bacteriano, se considera la presente invención tanto tratamiento como profilaxis, ya que la inflamación de las encías o de los alvéolos dentales en las formas más graves de piorrea tiene consecuencias al nivel de los sitios dentales, que consiste principalmente en la formación de bolsas periodontales, que, a su vez, facilitan la colonización bacteriana, la recurrencia de la infección y la cronización de la enfermedad. Además, como es evidente a partir de los datos experimentales presentados, el extracto en bruto no sólo antagoniza el estímulo proinflamatorio (que consiste en el caso específico del LPS procedente de *P. gingivalis*) cuando se administra junto con éste, sino también cuando se administra antes o después de éste (hasta al menos 4 horas más tarde). Para el tratamiento y/o prevención se refiere tanto al tratamiento profesional por parte de un dentista, por ejemplo una limpieza de las bolsas periodontales, como el mantenimiento de una mejor higiene oral mediante el uso de los dispositivos de la invención: pasta de dientes, geles, colutorios, caramelos y goma de mascar, con cualquiera de las composiciones y dispositivos de la invención.

[0016] La presente invención también incluye el uso cosmético de las composiciones descritas, para el tratamiento de enrojecimiento gingival en casos leves de gingivitis.

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1. Preparación del extracto procedente de cultivos de *Oscillatoria Planktothrix* FP1.

[0017] El extracto se preparó a partir de la cianobacteria *Oscillatoria Planktothrix* FP1 (12) mediante la adaptación a las necesidades actuales del procedimiento para la extracción fría de lipopolisacáridos (LPS), que se usó hasta la fecha únicamente para la extracción de LPS de bacterias gram-negativas, como se describe en Yi y col. En detalle, se diluyeron cianobacterias (CCAP 2 N^o 1459/45, 9 de julio de 2008, Escocia, Reino Unido) 1:1 en agua, se mezclaron con 3 volúmenes (donde el volumen unitario es el volumen total de cianobacterias diluidas en agua) de Tri reagent (Sigma-Aldrich N^o cat. T3934) y 1 volumen de cloroformo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

[0018] Al final de la incubación, se realizó la centrifugación a 2000xg durante 15 min y el sobrenadante (fase acuosa) que contenía la fracción activa se recogió y se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida seguido de tinción de plata. Esto se siguió de una extracción adicional de cianobacterias, por la adición de nuevo de agua (en una cantidad igual a la cantidad eliminada) y la recentrifugación de muestras. Los sobrenadantes recogidos de este modo se precipitaron con acetato sódico (10 mM finales), 2 volúmenes de acetona y se centrifugaron. Al final de la centrifugación, el sobrenadante se eliminó y el gránulo se lavó adicionalmente dos veces con etanol al 70%. Posteriormente, el sobrenadante de la etapa de lavado se eliminó y el gránulo se disolvió en una solución TRIS 50 mm para la digestión de ARNasa y ADNasa seguida de la digestión con proteinasa K (100 µg/ml) durante una noche de incubación a 37 °C. Al día siguiente la muestra se centrifugó a 2000xg durante 15 min; el sobrenadante se recuperó y se precipitó en acetato sódico (10 mm finales) y 2 volúmenes de acetona. El gránulo obtenido de este modo se suspendió de nuevo en agua y se pasó a través de un filtró con un corte de 30 KD, eliminando de este modo todos los componentes con un peso molecular inferior.

[0019] El retentado se diluyó de nuevo en un volumen adecuado de agua con el fin obtener una concentración de la fracción de glicolípido de al menos 1 mg/ml para posteriores ensayos biológicos. El extracto obtenido de este modo mostró una contaminación por proteínas <2% y una contaminación por ácidos nucleicos <5%.

Ejemplo 2. Inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias inducida por LPS de *P. gingivalis*.

[0020] La fracción de glicolípido procedente de *Oscillatoria Planktothrix FP1*, preparada como se ha descrito en el ejemplo anterior, se usó para estudiar los efectos *in vitro* en la producción de citocinas proinflamatorias en una línea celular monocítica humana (THP1). Los monocitos se llevaron a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml, se sembraron en placas de 24 pocillos (1 ml/pocillo) y se incubaron con LPS de *P. gingivalis* a una concentración de 1 µg/ml en ausencia o presencia del extracto cianobacteriano a diversas concentraciones (1-20 µg/ml). Los cultivos también se hicieron únicamente en presencia de extracto cianobacteriano a una concentración de 10 µg/ml. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% durante 18-20 horas. Después de la incubación, los sobrenadantes se recogieron y las citocinas proinflamatorias se cuantificaron mediante el uso de un kit Diaclone ELISA intercalado (kit ELISA TNF-alfa humano N° cat. 950.090.096, kit ELISA IL-6 humano N° cat. 950.030.096, kit ELISA IL-8 humano N° cat. 850.050.096, kit ELISA IL1-beta humano N° cat. 850.006.096) (5).

[0021] Los resultados mostraron que el extracto cianobacteriano es incapaz de inducir la producción de citocinas proinflamatorias en células THP-1.

[0022] En presencia de 1 µg/ml de LPS ultrapuro de *P. gingivalis* (Invivogen LPS-PG) que estimula la producción de citocinas en la línea monocítica, el extracto añadido simultáneamente al LPS bacteriano inhibe significativamente la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 1 beta (IL-1 beta), la interleucina 8 (IL-8) en una forma dependiente de la dosis/respuesta.

[0023] Considerando como el 100% la producción de citocinas proinflamatorias inducida por LPS de *P. gingivalis*, el extracto en bruto a una concentración de 1 µg/ml demostró ser capaz de inhibir la producción de TNF-alfa en el 90% ± 10, de IL-6 en el 92% ± 5, de IL-8 en el 75 ± 10%, de IL-1 beta en el 62 ± 8% (los porcentajes representan el promedio de los datos por triplicado).

[0024] A una concentración de 20 µg/ml, el extracto demostró ser capaz de inhibir en gran medida la producción de las citocinas proinflamatorias ensayadas, en un intervalo entre el 95% y el 100% (figura 1). A una concentración de 20 µg/ml, el extracto demostró ser capaz de ejercer sus efectos inhibidores incluso cuando se añadió varias horas después de LPS de *P. gingivalis* (figura 1, paneles 1-4, hasta 4 horas después).

Ejemplo 3. Evaluación de toxicidad, estabilidad y solubilidad del extracto cianobacteriano en mezclas compuestas.

Toxicidad

[0025] El extracto de *Oscillatoria Planktothrix FP1* se ensayó tanto en líneas celulares diferentes (THP1, RAW 264.7, SKMEL-28, HEY4, SHSY-5Y) como en células mononucleares obtenidas de sangre periférica (PBMC, células mononucleares de sangre periférica) a concentraciones entre 1 y 100 µg/ml y demostró no ser tóxico incluso cuando se usó a la mayor concentración (100 µg/ml).

Estabilidad en solución

[0026] El extracto de *Oscillatoria Planktothrix FP1* preparado como se ha descrito en el ejemplo 1 se mezcló con

digluconato de clorhexidina en agua durante 30 min a temperatura ambiente; posteriormente, después de la purificación para eliminar la clorhexidina, su eficacia sobre los cultivos celulares de monocitos se ensayó de nuevo. Los resultados muestran que el extracto de glicolípido conserva su actividad, según se mide por la capacidad de inhibir la producción de TNF-alfa inducida por LPS de *P. gingivalis*. La inhibiciones fueron del 95%, 96% y el 99% en presencia del extracto respectivamente a concentraciones de 1, 2, 4 µg/ml, por analogía a las observadas en ausencia de clorhexidina. La viabilidad celular se comprobó en los mismos cultivos al final del tiempo de incubación y demostró ser del 100% en todos los cultivos.

Estabilidad en una matriz sólida

[0027] El extracto de *Oscillatoria Planktothrix FP1* se incrustó en una matriz de hidroxietilcelulosa y, después de un mes, se ensayó para comprobar su actividad biológica. Además en este caso, los resultados mostraron que el extracto de glicolípido conserva su actividad biológica con un grado de inhibición igual al 90%, 93% y al 96%, respectivamente, a concentraciones de 1, 2, 4 µg/ml, sin afectar a la viabilidad celular.

Estabilidad térmica

[0028] El extracto procedente de *Oscillatoria Planktothrix FP1* preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1, y disuelto en agua, se llevó a 100 °C durante 5 min y posteriormente se ensayó para comprobar su actividad biológica. Incluso en este caso, los resultados demostraron que el extracto de glicolípido conserva la actividad inhibidora en la producción del TNF-alfa inducido por LPS de *P. gingivalis* sin afectar a la viabilidad celular.

Solubilidad

[0029] El extracto de *Oscillatoria Planktothrix FP1* que se ha preparado en el ejemplo 1 se disolvió en agua a diversas concentraciones hasta 100 veces superior que la concentración óptima ensayada en el experimento que se ha descrito en el ejemplo 2.

[0030] La Tabla 1 presenta los datos de solubilidad en agua y dimetilsulfóxido (DMSO).

Tabla 1: Solubilidad del extracto de glicolípido

Concentración del Extracto	DISOLVENTE	
	AGUA	DMSO
1 mg/ml	+	+
2 mg/ml	+	+
4 mg/ml	+	nd
8 mg/ml	+	nd

REFERENCIAS

[0031]

1. Teng Y-TA. 2006. Protective and destructive immunity in the periodontum: part 1- Innate and humoral immunity and the periodontum. J. Dent. Res. 85: 198-208.
2. Bodet C, Chandad F, Grenier D. 2006. Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia. Microbes Infection 8: 27-35.
3. Bodet C, Chandad F, Grenier D. 2005. Porphyromonas gingivalis-induced inflammatory mediator profile in an ex vivo human whole blood model. Clin. Exp. Immunol. 143: 50-57.
4. Wang P-L, Ohura K. 2002. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and toll-like receptors. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 13: 132:142.
5. Shapira L, Champagne C, Van Dyke TE, Amar S. 1998. Strain-dependent action of monocytes and inflammatory macrophages by lipopolysaccharide of Porphyromonas gingivalis. Infect. Immunity 66: 2736-2742.
6. Saba JA, McComb ME, Potts DL, Costello CE, Amar S. 2007. Proteomic mapping of stimulus-specific signalling pathways involved in THP-1 cells exposed to Porphyromonas gingivalis or its purified components. J. Proteome Res. 6: 2211-2221.
7. Werts C, y col. 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR-2 dependent mechanism. Nature 2: 346-352.
8. Darveau RP, y col. 2004. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. Infect. Immunity 72: 5041-5051.
9. Zhou Q, Amar S. 2007. Identification of signaling pathways in macrophage exposed to Porphyromonas

gingivalis or to its purified cell wall components. J. Immunol. 179: 7777-7790.

10. Macagno A., y col. 2006. A cyanobacterial LPS antagonist prevents endotoxin shock and blocks sustained TLR4 stimulation required for cytokine expression. J. Exp. Med. 203: 1481-92.

5 11. Yi EC, Hackett M. 2000. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. Analyst 125: 651-656.

12. Pomati y col., 2000. The freshwater Cyanobacterium *Planctothrix* SP. FP1: Molecular Identification and Detection of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins J. Phycol, 36: 553-562 (2000).

13. Chomczynski P. y Mackey "Modification of the tri-reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide-and proteoglycan-rich sources" 19: 924 (1995).

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Fracción de glicolípido procedente de *Oscillatoria Planktothrix sp.* para su uso en el tratamiento y/o la prevención de patologías gingivales con una etiología bacteriana, teniendo dicha fracción un grado de contaminación por proteínas inferior o igual al 2% y un grado de contaminación por ácidos nucleicos inferior o igual al 5%.
- 10 2. La fracción de glicolípido procedente de *Oscillatoria Planktothrix sp.* para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente etiológico se selecciona entre el grupo que consiste en: *Actinobacillum actinomycetemconcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*.
- 15 3. La fracción de glicolípido procedente de *Oscillatoria Planktothrix sp.* para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el agente etiológico es *Porphyromonas gingivalis*.
- 20 4. La fracción de glicolípido procedente de *Oscillatoria Planktothrix sp.* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha patología gingival se selecciona entre el grupo de: gingivitis y periodontitis (piorrea).
5. Uso de la fracción de glicolípido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la preparación de una composición oral para el tratamiento y/o la prevención de patologías gingivales con una etiología bacteriana.

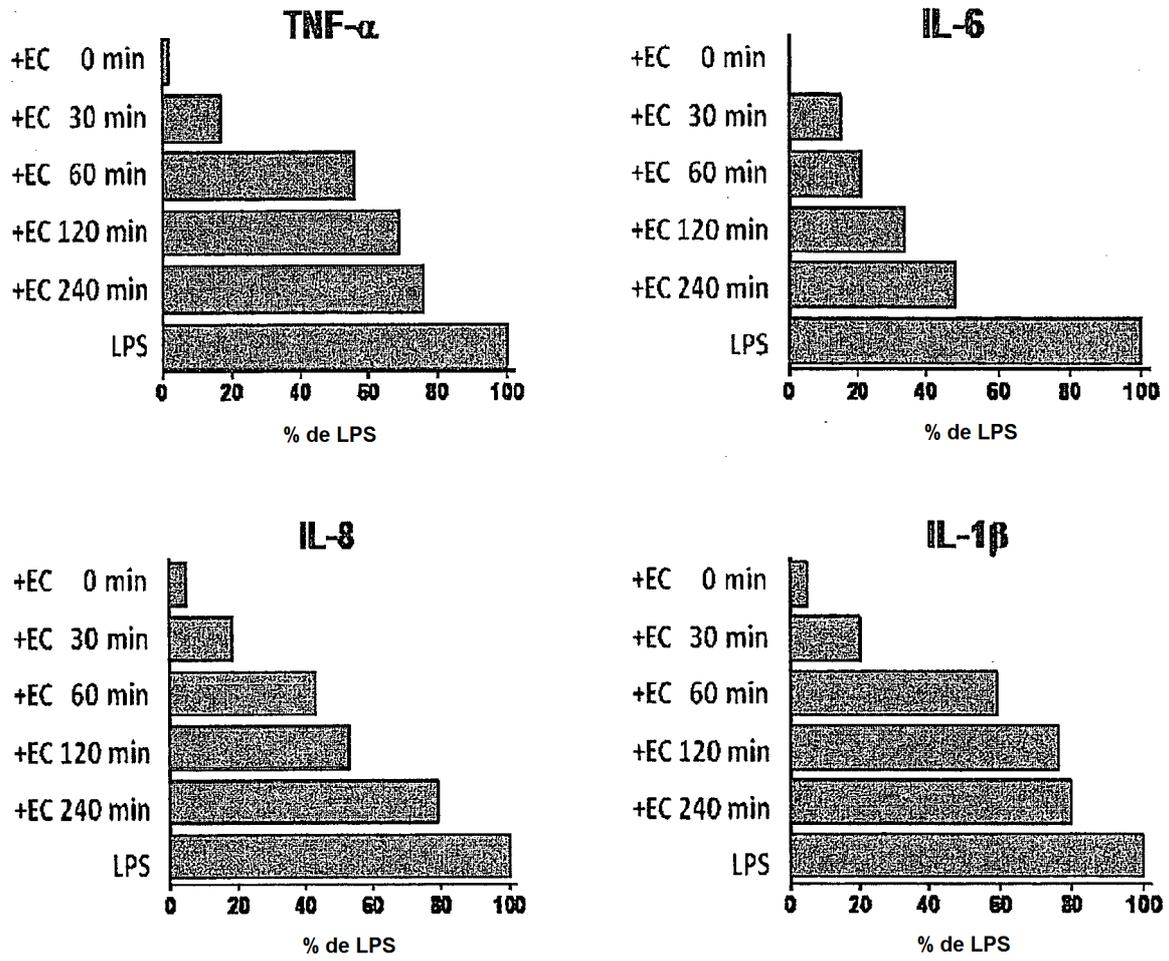


FIGURA 1