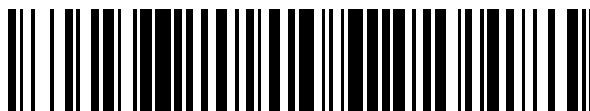


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 875**

51 Int. Cl.:

A61K 31/745 (2006.01)

A61K 36/22 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2010 PCT/IL2010/000183**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO2010100650**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2010 E 10712171 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2403505**

54 Título: **Usos terapéuticos de masilla de goma**

30 Prioridad:

04.03.2009 US 157215 P

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

20.06.2017

73 Titular/es:

**REGENERA PHARMA LTD. (100.0%)
18 Einstein Street
7414002 Ness Ziona, IL**

72 Inventor/es:

HAZAN, ZADIK

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 617 875 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).

Usos terapéuticos de masilla de goma**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La invención se refiere a usos terapéuticos de masilla de goma, y los compuestos que se encuentran en el mismo incluyendo mirceno polimérico. Más particularmente, la invención describe métodos para tratar una función neurológica alterada usando composiciones que comprenden mirceno polimérico.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La búsqueda de nuevas entidades de medicamentos derivados de plantas y productos vegetales para diversas aplicaciones terapéuticas tiene sus orígenes en la antigüedad y continúa hasta el presente. Una de tales fuentes es masilla, también conocida como masilla de goma o goma de masilla, que es una resina de árbol obtenida como un exudado de *Pistacia lentiscus* L., un miembro de la familia Anacardiaceae. La masilla se utilizó en el mundo mediterráneo antiguo para trastornos gastrointestinales como gastralgia, dispepsia y úlcera péptica. Se ha divulgado que la administración oral de masilla a pacientes humanos con úlcera duodenal y a ratas experimentales con úlceras gástricas y duodenales inducidas tiene efectos terapéuticos (Al-Habbal y col. (1984) Clin Exp Pharmacop Physio 11 (5): 541-4; Et al (1986) J Ethnopharmacol 15 (3): 271 - 8). Si bien se ha descrito que la masilla tiene efectos bactericidas *in vitro* contra *Helicobacter pylori*, causando el agente etiológico la enfermedad de úlcera de péptido (Marone et al (2001) J Chemother 13: 611-614), otros informes describen que la masilla no ejerce actividad antibacteriana en la administración a pacientes humanos positivos *H. pylori* (Bebb et al (2003) J Antimicrob Chemother 52: 522-23) o ratones experimentalmente infectados (Loughlin et al (2003) J Antimicrob Chemother 51: 367-371).

15

20

25

[0003] La patente griega nº GR 1.003.541 da a conocer acción antimicrobiana y antifúngica del aceite de masilla quíos extraído de las hojas, ramas y frutas de *Pistacia lentiscus* var. Chia Patente Griega nº GR 1.003.868 describe el uso de un producto derivado de *Pistacia lentiscus* var. Chia como un antioxidante, como un inductor de curación de heridas y como un agente citostático.

30

[0004] La publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2005/0238740 describe que ciertas fracciones extraídas a partir de resina de masilla muestran actividades proliferativas anti-microbianas y anti-celulares. Según la descripción, un primer extracto (denominado "fracción total" o "extracto entero") contiene todos los compuestos de la goma masilla excepto la resina polimérica; un segundo extracto es una fracción ácida que contiene todos los ácidos triterpénicos de la fracción total y un tercer extracto es una fracción neutra que contiene todos los otros terpenos de la fracción total. Además se describe un aceite esencial obtenido de la destilación que contiene monoterpenos incluyendo β -mirceno. La solicitud describe formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las fracciones totales, ácidas o neutras antes mencionadas, opcionalmente combinadas con aceite esencial de TH e, o equivalentes sintéticos de los mismos, o que comprenden productos aislados de componentes o equivalentes sintéticos de los mismos, así como su uso en métodos para el tratamiento de infecciones microbianas, incluyendo *H. pylori*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, y la hiperproliferación celular. Paraschos et al (2007), escrito por algunos de los inventores de la solicitud de patente antes mencionada, dan a conocer la preparación de un extracto de masilla total, sin polímero (TMEWP), preparado por extracción con disolventes polares de la masilla cruda y la eliminación del polímero insoluble de poli β -mirceno, y fracciones ácidas y neutras separadas de TMEWP (Paraschos et al. (2007) Antimicrob Agents Chemother 51 (2): 551 - 559). Según la descripción, la administración de TMEWP a ratones infectados *H. pylori* durante un período de 3 meses dio como resultado una reducción de 30 veces de la colonización bacteriana, en gran parte atribuible a un compuesto particular purificado a partir de la fracción de ácido. Los autores indican que TMEWP se preparó al especularse que el alto porcentaje de β -poli-mirceno en preparaciones de masilla de crudo, tal como se utiliza en estudios anteriores, obstaculiza la potencial actividad *in vivo* durante la administración oral. Los autores describen además que la eliminación de la poli β -mirceno produce una fracción terapéutica mejorada con actividad anti-*H. pylori*.

35

40

45

50

[0005] La solicitud de patente EP nº 1.520.585 describe el uso de un producto obtenido a partir de una planta del género *Pistacia* para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer. Según la descripción, los aceites esenciales por destilación a partir de hojas, ramas, frutas, nueces y flores de diferentes especies *Pistacia* contienen un gran número de compuestos de terpeno monoméricos en proporciones variables *inter alia* β -mirceno. La solicitud describe además que los aceites tienen actividad contra ciertas líneas de células tumorales tales como colon y adenocarcinomas de ovario y que el acetato de bornilo era el único componente único que se ha encontrado que tiene actividad anticancerígena.

55

60

[0006] La solicitud de solicitud de patente internacional nº WO 2005/112967 describe la purificación de masilla de material de anti-cáncer que tiene efectos anti-proliferativos, que se encuentran en una fracción soluble obtenida por masilla de suspensión en un disolvente seleccionado de un hidrocarburo no ácido, alifático, una solución acuosa que contiene al menos 25% de un hidrocarburo alifático, no ácido, soluble en agua, o una combinación de los mismos, y la eliminación de la fracción insoluble. La solicitud describe adicionalmente un método para tratar células cancerosas que comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una fracción de resina de goma

65

masillaada que inhibe el crecimiento de células cancerosas. De acuerdo con la descripción, el compuesto anticancerígeno es eficaz contra diversos tipos de células cancerosas, incluyendo células de cáncer de colon humano.

5 **[0007]** Van der Berg et al (1998) describe el aislamiento y la purificación de la fracción de polímero de masilla mediante la extracción y la cromatografía de exclusión por tamaño (Van der Berg et al (1998) Tetrahedron Lett 3: 2645-2648). De acuerdo con el cierre de esto, el polímero tiene una distribución de peso molecular ancha, es decir 20.000 a 100.000 Da, se forma a partir de unidades de monómero de 136 Da, y tiene la estructura de 1,4-poliβ-mirceno, con configuraciones cis y trans en una proporción de 3: 1. Los autores afirman que su divulgación es el primer informe de un polímero de origen natural de un monoterpeneo.

10 **[0008]** Barra et al (2007) describe la extracción y el análisis de cromatografía de gases del aceite esencial de *P. lentiscus* L. (Barra et al (2007) J Agric Food Chem 55 (17): 7.093-7.098). Según la descripción, se identificó un total de 45 compuestos, incluyendo β-mirceno como uno de los principales compuestos. Marner et al (1991) describen la identificación de varios triterpenoides de masilla de goma de *P. lentiscus* (Marner et al (1991) Fitoquímica, 30, 3709 a 3712).

15 **[0009]** La patente de EE.UU. nº 5.506.406 da a conocer aceite de masilla producido mediante la disolución de masilla en un aceite o grasa, y llenado en una cápsula blanda que contiene además opcionalmente una sustancia anfipática tal como quitina o quitosano. Según la descripción, la cápsula es eficaz para la eliminación y la inhibición de *H. pylori*, y para reducir el olor de las heces.

20 **[0010]** La patente de EE.UU. nº 5.637.290 da a conocer un producto de higiene oral, que comprende la combinación de una pasta de dientes y un ingrediente seleccionado de masilla natural, aceite de masilla extraído y agentes de aceite de masilla sintéticos. También se describe el uso de masilla para su incorporación en crema solar, productos para el cabello y cosméticos.

25 **[0011]** La patente de EE.UU. nº 6.623.728 describe composiciones de emulsión de cuidado cosmético de la piel que comprenden de aproximadamente 0,001% en peso a 10% en peso de masilla de goma solubilizada; un disolvente volátil miscible en agua; y un vehículo cosméticamente aceptable. De acuerdo con la descripción, la emulsión es preferiblemente una emulsión de aceite en agua, y los disolventes preferidos incluyen etanol, metanol propanol, alcohol isopropílico y mezclas de los mismos. De acuerdo con la descripción, se usan los mismos tipos de disolventes para obtener la masilla de goma solubilizada.

30 **[0012]** La patente de EE.UU. nº 6.811.769 da a conocer una composición oral que comprende un extracto de aceite de masilla, tal como la preparada con aceite de oliva o aceite de palma; Y un antiphlogistic, tal como ácido glycyrrhizic. De acuerdo con la descripción, la composición tiene acción antibacteriana contra las bacterias relacionadas con la enfermedad periodontal y contra las bacterias relacionadas con la caries dental.

35 **[0013]** La patente de EE.UU. nº 7.294.651 describe el uso de compuestos isoprenoides, compuestos de terpeno *inter alia*, para la inhibición de la producción de exoproteínas de bacterias positivas Gram, tales como síndrome de choque tóxico de la toxina-1 producida por *S. aureus*. De acuerdo con la divulgación, terpenos adecuados pueden ser cíclicos o acíclicos, saturados o insaturados, y también incluyen *politerpenos*, *inter alia*. También se describe el uso de tales compuestos para preparar composiciones que pueden incorporarse en soluciones acuosas, tales como formulaciones de limpieza vaginal.

40 **[0014]** La patente de EE.UU. nº 4.564.718 da a conocer la preparación de polímeros funcionalmente terminados, que se refiere como "cauchos líquidos" que tienen temperaturas de transición vítrea sustancialmente inferior a la temperatura ambiente, por polimerización de un derivado de terpeno o el oxígeno del mismo que tiene un doble enlace o un doble enlace conjugado disponible para polimerización, con un iniciador que proporciona la terminación funcional deseada. Según la descripción, los polímeros tienen preferiblemente un peso molecular de 500 a 20.000, y monoterpeneos acíclicos preferidos para la preparación de los mismos son β-mirceno *inter alia*. La patente describe la preparación de mirceno polimérico de peso molecular de aproximadamente 2000 y de aproximadamente 4000. La patente describe además que los polímeros de la invención pueden hacerse reaccionar con otros reactivos para proporcionar elastómeros, sellantes o adhesivos, o pueden ser utilizados como agentes de endurecimiento de caucho. Se describe adicionalmente la preparación de polimirceno terminado en hidroxilo a partir de mirceno y su uso para preparar un elastómero de poliuretano.

45 **[0015]** Newmark et al J. Polymer Sci 26, 71-77 (1988) describe la síntesis de polimirceno que tiene un peso molecular observado de 87.000 y un peso molecular calculado de 46.000.

50 **[0016]** La patente de EE.UU. nº 4.374.957 da a conocer un polímero elastómero de tres bloques lineales termoplásticos pegajosos correspondientes a la fórmula A-B-A, en donde A es un bloque de homopolímero lineal no elástico de un hidrocarburo monovinil-aromático que tiene un peso molecular de promedio entre 10.000 y 60.000 y una temperatura de transición vítrea por encima de 70°C, y en la que B es un bloque homopolimérico elastomérico de mirceno que tiene un peso molecular de promedio entre 50.000 y 200.000 y una temperatura de transición vítrea

por debajo de aproximadamente -40°C.

[0017] La patente de EE.UU. nº 5.759.569 da a conocer artículos compostables biodegradables que al menos parcialmente comprenden ciertos polímeros trans, en los que los polímeros tienen un peso molecular promedio en peso de al menos aproximadamente 20.000 y se hacen por polimerización de un componente monómero que comprende: (1) de aproximadamente 70 a 100% en moles de 1,3-dienos β -mirceno *inter alia*; y (2) hasta aproximadamente 30% en moles de otros comonomeros compatibles. De acuerdo con la divulgación, los artículos incluyen materiales de embalaje, *inter alia*; artículos absorbentes desechables (por ejemplo, pañales, compresas higiénicas); artículos de prendas de vestir tales como ropa protectora, cortinas quirúrgicas, batas quirúrgicas, sábanas quirúrgicas; materiales tejidos, cosidos y no tejidos; esponjas quirúrgicas, aplicadores de tampones, jeringas desechables y recipientes.

[0018] La patente de EE.UU. nºs 7.232.872 y 7.214.750 describen un procedimiento de polimerización que comprenden la puesta en contacto de uno o más monómero(s) mirceno *inter alia*, uno o más ácido(s) Lewis, uno o más iniciador(es), y un diluyente que comprende uno o más hidrofluorocarbono(s) en un reactor.

[0019] La publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2007/0179260 y la patente de EE.UU. nº 7.417.103, describe polímeros a base de 3,4-isopreno con alta regioregularidad y un método para producir la misma. De acuerdo con estas descripciones, el peso molecular promedio en número del polímero es de 5000 a 6.000.000, y el polímero también puede incluir unidades de 1,4-isoprenos tales como mirceno. De acuerdo con la descripción, el polímero es adecuado para su uso como material plástico debido a su durabilidad mecánica y térmica.

[0020] Mansouri et al. (2005) describe los efectos neuroprotectores de un extracto de etanol-agua de goma *Pistacia vera L.* contra el daño oxidativo durante la reperusión de isquemia cerebral experimental en ratas (Mansouri et al. (2005) Iranian Biomedical Journal 9 (4): 181-185). Dicha referencia no describe una fracción específica del extracto que comprende mirceno.

[0021] Khan et al. (2006) describe la prevención de deterioros cognitivos y la neurodegeneración por medio de "Khamira Abresham Hakim Arshad Walan" (KAHAW), un producto que contiene una mezcla de componentes minerales, vegetales y animales, uno de dichos componentes es la goma de masilla (Khan et al (2006) J. of Ethnopharmacology 108: 68 - 73). Dicha referencia no describe una fracción específica de goma de masilla que comprende mirceno.

[0022] Yousuf et al. (2005) describe los efectos protectores de "Khamira Abresham Uood Mastagiwala" (KAUM) contra el daño inducido libremente inducido en la isquemia cerebral focal en animales de experimentación (Yousuf et al (2005) J. of Ethnopharmacology 99: 179-184). KAUM es una mezcla de componentes minerales, vegetales y animales, uno de ellos es la goma de masilla. Dicha referencia no describe una fracción específica de goma de masilla que comprende mirceno.

[0023] La técnica anterior no da a conocer el uso de la goma de masilla o fracciones de los mismos para el tratamiento de enfermedades neurológicas. La técnica anterior no enseña ni sugiere el uso de fracciones aisladas de goma de masilla en una composición para tratar afecciones neurológicas. La técnica anterior tampoco enseña o sugiere el uso ventajoso de una fracción aislada de mirceno polimérico, ya sea derivado de masilla o que se sintetiza químicamente, como un ingrediente activo en una composición farmacéutica o en una aplicación terapéutica.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0024] La presente invención proporciona composiciones que tienen propiedades neuroprotectoras y neuro-regenerativas y sugiere métodos de uso para el tratamiento de una serie de enfermedades neurológicas y trastornos. Más específicamente, las composiciones que comprenden fracciones aisladas extraídas de goma de masilla se describen ahora que tienen actividades neuroprotectoras y pueden usarse para promover la diferenciación y maduración de tipos de células neuronales y otros tipos de células.

[0025] La presente invención se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que determinadas fracciones aisladas de la goma de masilla exhiben actividades biológicas neuroprotectoras y neuro-regenerativas que pueden ser explotadas para una variedad de aplicaciones terapéuticas. Más específicamente, las composiciones que comprenden tales fracciones aisladas tienen actividad para inducir la diferenciación celular de una variedad de tipos celulares, incluyendo tipos de células neuronales. La actividad de inducción de diferenciación se ha observado en múltiples linajes celulares, incluyendo varios tipos celulares de los linajes ectodérmico, mesodérmico y endodérmico.

[0026] Los nuevos usos de la presente invención pueden ponerse en práctica con cualquiera de las fracciones aisladas y extractos de la goma de masilla como se conoce en la técnica. Sin embargo, la presente invención describe además que algunas fracciones seleccionadas que comprenden componentes de más alto peso molecular de goma de masilla son particularmente ventajosas para uso en las composiciones y usos sugeridos de la presente invención.

[0027] Se conocen extractos de la goma de masilla para comprender formas poliméricas del compuesto monoterpeneo conocido como mirceno. Por tanto, se describe además por primera vez que se puede emplear una fracción aislada de goma de masilla que comprende mirceno polimérico como ingrediente activo en composiciones farmacéuticas para tratar trastornos neurodegenerativos. Las enfermedades que pueden ser susceptibles de tratamiento con las composiciones de la invención incluyen diferentes tipos de demencia, incluyendo, pero sin limitarse a la enfermedad de Alzheimer, el accidente cerebrovascular y la enfermedad de Parkinson. También se describe por primera vez que pueden emplearse fracciones aisladas de mirceno polimérico, ya sea obtenido de fuentes vegetales o químicamente sintetizadas, como ingrediente activo en composiciones farmacéuticas para tratar trastornos neurodegenerativos, así como para tratar el daño tisular.

[0028] Las enseñanzas de la presente invención se han ejemplificado tanto con las fracciones aisladas de la goma de masilla que incluyen mirceno polimérico, y con mirceno polimérico sintetizado químicamente correspondiente al polímero aislado a partir de la goma de masilla. La presente invención es particularmente sorprendente e inesperada respecto a las enseñanzas de la técnica anterior que describen el uso de fracciones de extracto de goma de masilla de las que se ha eliminado el mirceno polimérico, para diferentes indicaciones terapéuticas. Además, la técnica anterior afirma que las fracciones poliméricas derivadas de masilla no son terapéuticamente útiles, y que la presencia de mirceno polimérico en composiciones terapéuticas realmente inhibe las actividades biológicas beneficiosas y la biodisponibilidad de los compuestos activos. Por lo tanto, la técnica anterior atribuye actividades terapéuticas de la goma de masilla a diversas moléculas de bajo peso molecular de tipo terpeno, *inter alia*, mirceno monomérico y pequeñas formas oligoméricas de mirceno. Sin embargo, los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente, y contrariamente a las enseñanzas de la técnica anterior, que ciertos terpenos de bajo peso molecular presentes en extractos de goma de masilla interfieren y bloquean realmente la actividad de las fracciones y composiciones descritas en la presente invención para inducir diferenciación celular. Se describe así que la nueva actividad biológica de las fracciones y composiciones descritas en la presente invención está inhibida por la presencia de ciertas formas oligoméricas monoméricas y pequeñas de diversos terpenos.

[0029] Sin desear estar ligado por ninguna teoría particular o mecanismo de acción, la actividad de composiciones que comprenden mirceno polimérico para la inducción de la diferenciación celular neuronal, como se describe en el presente documento, hace que la presente invención sea útil para la reformación de las uniones inter-neuronales y la superación de la comunicación inter-neuronal defectuosa en el cerebro y el tejido neural afectado por patologías asociadas con la formación sináptica inadecuada. Esta patología subyace a muchas patologías del sistema nervioso, incluyendo por ejemplo la enfermedad de Alzheimer. Además, la invención puede usarse para revertir efectos adversos de diversos fármacos que actúan sobre el sistema nervioso, tales como anestésicos. La invención es útil para el rejuvenecimiento de un gran número de células y tejidos.

[0030] Tal como se usa en el presente documento "mirceno polimérico" abarca formas poliméricas de mirceno que tienen un grado de polimerización de al menos 6. Mirceno polimérico incluye, sin limitación, β -mirceno polimérico (poli β -mirceno), α -mirceno polimérico (poli- α -mirceno), homopolímeros de los mismos y heteropolímeros (también conocidos como copolímeros) que contienen subunidades de mirceno. También se incluyen isómeros geométricos, isómeros ópticos y diastereoisómeros de compuestos de mirceno polimérico.

[0031] Como se usa en este documento, β -mirceno se refiere a 7-metilo-3-metileno-1,6-octadieno y α -mirceno se refiere al isómero estructural 2-metilo-6-metileno-1,7-octadieno.

[0032] De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona una fracción aislada de la goma de masilla que comprende mirceno polimérico para su uso en el tratamiento de una alteración de la función neurológica. La fracción se puede obtener mediante:

- a) poner en contacto la goma de masilla con al menos un disolvente orgánico polar;
- b) aislar una fracción que es soluble en al menos un disolvente orgánico polar;
- c) tratar la fracción soluble obtenida en la etapa b) con al menos un disolvente orgánico no polar seleccionado de un C₅-C₁₀-alcano,
- d) aislar una fracción que es soluble en dicho disolvente orgánico no polar, en donde las etapas a) a b) y c) a d) se realizan cada una independientemente durante un número de ciclos,

en el que la fracción está sustancialmente desprovista de compuestos que son solubles en dicho disolvente orgánico polar pero insolubles en dicho disolvente orgánico no polar,

En el que el al menos un disolvente orgánico polar es un alcohol seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, sec-butanol, t-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-metilo-2-butanol, 2-metilo-2-butanol, etilenglicol y éter monometílico de etilenglicol y mezclas de los mismos. La función neurológica alterada comprende una disminución en una función seleccionada del grupo que consiste en función cognitiva, función sensorial, función motora y combinaciones de las mismas.

[0033] Según una realización preferida, el disolvente polar es el etanol y el disolvente no polar es hexano.

[0034] De acuerdo con una realización preferida adicional, el mirceno polimérico se selecciona del grupo que

consiste en β -mirceno polimérico (poli- β -mirceno), α -mirceno polimérico (poli- α -mirceno), copolímeros de mirceno y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el polo- β -mirceno se selecciona del grupo que consiste en cis-1,4-poli- β -mirceno, trans-1,4-poli- β -mirceno, 3,4-poli- β -mirceno, 1,2-poli- β -mirceno y combinaciones de los mismos.

5 **[0035]** De acuerdo con una realización, la fracción aislada de goma de masilla comprende una mezcla de cis-1,4-poli- β -mirceno y trans-1,4-poli- β -mirceno, y en el que la mezcla comprende al menos 75% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno.

10 **[0036]** Según otra forma de realización, la fracción aislada de la goma de masilla comprende al menos 75% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular de promedio en número en el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 20.000, preferiblemente en el que el peso molecular promedio en número está en el intervalo de al menos aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000.

15 **[0037]** De acuerdo con una realización, la función neurológica alterada está asociada con una afección seleccionada del grupo que consiste de un traumatismo, demencia vascular, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson y accidente cerebrovascular.

20 **[0038]** De acuerdo con otra realización, la fracción aislada está adaptada para administración oral, tópica, parenteral, o transdérmica.

25 **[0039]** De acuerdo con otra forma de realización, la fracción aislada de la goma de masilla está adaptada para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, intracerebral, intracerebroventricular, intraósea y la administración intratecal; o la fracción aislada de goma de masilla está adaptada para aplicación tópica seleccionada de dérmica, vaginal, rectal, inhalación, intranasal, ocular, auricular y bucal.

[0040] De acuerdo con una realización adicional, el disolvente orgánico no polar se selecciona del grupo que consiste en pentanos, hexanos, heptanos, octanos, nonanos, decanos, y sus mezclas.

30 **[0041]** De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, mirceno polimérico se utiliza en el tratamiento de una función neurológica alterada, en el que la función neurológica alterada comprende una disminución de una función seleccionada del grupo que consiste de la función cognitiva, la función sensorial, función motora y combinaciones de los mismos.

35 **[0042]** De acuerdo con una realización, el mirceno polimérico se utiliza en una composición, en la que la composición comprende de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25% (en peso) de mirceno polimérico basado en el peso total de la composición.

40 **[0043]** De acuerdo con otra realización, el mirceno polimérico comprende cis-1,4-poli- β -mirceno.

[0044] De acuerdo con todavía otra realización, la composición está adaptada para la administración oral, tópica, parenteral, y transdérmica.

45 **[0045]** De acuerdo con una realización adicional, el mirceno polimérico se deriva de una fuente vegetal.

[0046] De acuerdo con una realización, el mirceno polimérico se selecciona del grupo que consiste de β -mirceno polimérico (poli- β -mirceno), α -mirceno polimérico (poli- α -mirceno), copolímeros de mirceno y combinaciones de los mismos.

50 **[0047]** Disolventes orgánicos polares adecuados para la obtención de extractos incluyen alcoholes, éteres, ésteres, amidas, aldehídos, cetonas, nitrilos y combinaciones de los mismos. Ejemplos particulares de disolventes orgánicos polares son metanol, etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, sec-butanol, t-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, neopentanol, 3-metilo-1-butanol, 2-metilo-2-butanol, 2-metilo-2-butanol, etilenglicol, éter monometílico de etilenglicol, éter dietílico, éter metiletilico, éter etilpropílico, éter metilpropílico, 1,2-dimetoxietano, tetrahidrofurano, dihidrofurano, furano, pirano, dihidropirano, tetrahidropirano, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetaldehído, metilformiato, etilformiato, propionato de etilo, propionato de metilo, diclorometano, cloroformo, dimetilformamida, acetamida, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, acetona, etilmetilcetona, dietilcetona, acetónitrilo, propionitrilo y combinaciones de los mismos.

60 **[0048]** Los disolventes no polares adecuados para llevar a cabo la invención incluyen hidrocarburos alifáticos acíclicos o cíclicos, saturados o insaturados e hidrocarburos aromáticos, por ejemplo, alcanos C5-C10, cicloalcanos C5-C10, hidrocarburos aromáticos C6-C14, y combinaciones de los mismos. Cada uno de los anteriores puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, por ejemplo, perfluoroalcanos C7-C14. Ejemplos particulares de disolventes orgánicos no polares son pentanos, hexanos, heptanos, octanos, nonanos, decanos, benceno, tolueno, xileno e isómeros y mezclas de los mismos.

65

[0049] La goma de masilla se puede obtener de una especie de *Pistacia* seleccionada de entre el grupo que consiste en *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *P. palestina*, *P. saportae*, *P. terebinthus*, *P. vera* y *P. integerrima*.

[0050] El mirceno polimérico puede tener un grado de polimerización en el intervalo de al menos aproximadamente 6 a aproximadamente 1800.

[0051] Debe entenderse que la composición puede comprender diferentes fracciones de peso molecular de mirceno polimérico, por ejemplo en el intervalo de al menos aproximadamente 800 a aproximadamente 100.000, o varias combinaciones de los mismos. En un ejemplo particular, el mirceno polimérico puede tener un índice de polidispersidad inferior a 5.

[0052] El mirceno polimérico utilizado de acuerdo con algunos de los usos de la invención puede ser el producto de una síntesis química. La síntesis química puede comprender el uso de mirceno monomérico como sustrato. El sustrato puede ser β -mirceno. El sustrato β -mirceno" puede derivarse de una planta.

[0053] La composición puede comprender menos de aproximadamente 10% (en peso), y más preferiblemente, menos de aproximadamente 5% (en peso), de compuestos de terpeno que son solubles en un disolvente orgánico polar e insoluble en un disolvente orgánico no polar. La composición puede estar sustancialmente desprovista de compuestos terpénicos que son solubles en un disolvente orgánico polar e insoluble en un disolvente orgánico no polar. La composición puede comprender menos de aproximadamente 10% (p / p), y más preferiblemente, menos de aproximadamente 5% (p / p) de compuestos terpénicos monoméricos. La composición puede estar sustancialmente desprovista de monómeros de mirceno.

[0054] Tal como se indica en el presente documento, los compuestos terpénicos incluyen formas monómeras y oligómeras de compuestos terpénicos, incluidos los clasificados como monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sequiterpenos y tetraterpenos, incluyendo sus forma de ácido, aldehído y alcohol. En una realización particular, la composición comprende menos de aproximadamente 10% (en peso), y más preferiblemente, menos de aproximadamente 5% (en peso), de un compuesto de monoterpeno seleccionado de entre el grupo que consiste en: β -mirceno, α -mirceno, cis- α -ocimeno, dihidromirceno, limoneno, α -pineno, β -pineno, y combinaciones de los mismos.

[0055] La fracción aislada de mirceno polimérico puede ser derivado de una planta y la composición puede estar sustancialmente desprovista de monómeros de mirceno y formas oligoméricas de mirceno que tienen un grado de polimerización de menos de aproximadamente 6. La fracción aislada de mirceno polimérico puede derivarse de una planta y la composición puede estar sustancialmente desprovista de compuestos terpénicos que sean solubles en al menos un disolvente orgánico polar e insoluble en al menos un disolvente orgánico no polar.

[0056] Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede comprender un vehículo hidrófobo. El vehículo hidrofóbico farmacéuticamente aceptable puede comprender al menos un aceite. El aceite puede seleccionarse del grupo que consiste en un aceite mineral, un aceite vegetal y combinaciones de los mismos. En una realización particular, el aceite vegetal se selecciona del grupo que consiste en aceite de almendra, aceite de canola, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de uva, aceite de cacahuete de aceite de oliva, aceite de azafrán, aceite de sésamo, aceite de soja y combinaciones de los mismos. El aceite mineral puede ser aceite mineral ligero. El vehículo hidrófobo puede comprender al menos una cera. El vehículo hidrófobo puede comprender una combinación de al menos un aceite y al menos una cera.

[0057] La composición puede estar en una forma seleccionada del grupo que consiste de una cápsula, una tableta, un liposoma, un supositorio, una suspensión, una pomada, una crema, una loción, una solución, una emulsión, una película, un cemento, un polvo, un pegamento, un aerosol y un aerosol.

[0058] La composición puede ser una composición farmacéutica. La composición puede estar en una forma adecuada para la administración cosmética o dermatológica.

[0059] La etapa de administrar o poner en contacto células comprende el uso de un artículo de fabricación, en el que la composición está dispuesta en o dentro del artículo de fabricación. La composición puede estar dispuesta sobre el artículo de fabricación en forma de revestimiento. El artículo de fabricación puede comprender un recipiente, en el que la composición está dispuesta dentro del recipiente. El artículo de fabricación puede seleccionarse del grupo que consiste en un artículo de tela, un pañal, un apósito para heridas, un dispositivo médico, una aguja o una pluralidad de agujas, una microaguja o una pluralidad de microagujas, un dispositivo de inyección y un dispensador de pulverización. El artículo de fabricación puede comprender una pluralidad de microagujas. El dispositivo médico puede seleccionarse del grupo que consiste en una prótesis, un órgano artificial o un componente del mismo, una válvula, un catéter, un tubo, un stent, una membrana artificial, un marcapasos, un sensor, un endoscopio, un dispositivo de formación de imágenes, una bomba, un alambre y un implante. El implante puede seleccionarse del grupo que consiste en un implante cardíaco, implante coclear, implante corneal, implante craneal, implante dental, implante maxilofacial, implante de órgano, implante ortopédico, implante vascular, implante intraarticular e implante mamario.

[0060] Se ha de entender expresamente que el alcance de la presente invención abarca formas más cortas y más largas de mirceno polimérico, incluyendo las formas sintéticas y semi-sintéticas, incluyendo copolímeros de mirceno, y derivados sustituidos con varias funcionalidades, y conjugados con moléculas adicionales, como se conoce en la técnica, con la estipulación de que estas variantes y modificaciones preservan la capacidad terapéutica del mirceno polimérico en el contexto de los métodos de la presente invención.

[0061] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención quedarán claras a partir de la siguiente descripción y los dibujos.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0062]

15 **Figura 1** muestra la cromatografía de exclusión de un extracto de resina de masilla usando SEDEX y detectores PDA.

Figura 2 muestran fracciones de peso molecular bajas (Fig. 2A) y pesadas (Fig. 2B) de un extracto de resina de masilla obtenidas por cromatografía de exclusión por tamaño preparativa.

20 **Figura 3** muestra el espectro ^1H -RMN de la fracción de MW pesada obtenida por SEC preparativa de un extracto de resina de masilla.

Figura 4 muestra el espectro de ^{13}C -RMN de la fracción MW pesada obtenida por cromatografía de exclusión de tamaño preparativa de un extracto de resina de masilla.

25 **Figura 5** muestra la cromatografía analítica de exclusión de tamaño de productos altos (Fig. 5A) y bajos (Fig. 5B) obtenidos en un proceso de síntesis química para mirceno polimérico.

30 **Figura 6** muestra el espectro ^1H -RMN del 1,4-poli β -mirceno sintetizado.

Figura 7 muestra el espectro de ^{13}C -RMN de 1,4-poli β -mirceno sintetizado.

35 **Figura 8** muestra los efectos de RPh-1 en células ARPE-19. Fig. 8A, cultivos de control tratado con vehículo de aceite; Fig. 8B, cultivos de ensayo 48 horas después de RPh-1 (0,1%; 1 mg/ml) y la administración de incubación; Fig. 8C, cultivos de ensayo 48 horas después de la RPh-1 (0,25%; 2,5 mg/ml) y la administración de incubación; Fig. 8D cultivos de ensayo 72 horas después de RPh-1 (0,25%/ml 2,5 mg) y la administración de incubación.

40 **La Figura 9** muestra el análisis de inmunofluorescencia de las células ARPE-19 diferenciadas antes (paneles de la izquierda) y después (derecha) 72 horas de incubación con RPh-1, lo que indica la expresión de la tubulina, beta 3 (TUBB3), proteína asociada a citoesqueleto regulado por actividad (Arco/Arg3.1) y pentraxina neuronal II (NPTX2) después del tratamiento.

45 **Figura 10** muestra el efecto de RPh-1 sobre la proliferación celular ARPE-19 tal como se comprueba por un ensayo para evaluar el contenido de proteína total.

Figura 11 muestra células ARPE-19 de diversos grados de diferenciación. Fig. 11A, grado de diferenciación 3; Fig. 11B, grado de diferenciación 4; Fig. 11C, grado de diferenciación 5.

50 **Figura 12** muestra el efecto de RPh-1 en células de melanoma humano. Fig. 12A, células de control tratadas con vehículo de aceite; Fig. 12B, células tratadas con RPh-1 (5 μL) después de 48 horas de incubación, Fig. 12C, células tratadas con RPh-1 (2 μL) después de 48 horas de incubación; Fig. 12D, células tratadas con RPh-1 (5 μL) después de 72 horas de incubación.

55 **Figura 13** muestra los efectos de mirceno polimérico químicamente sintetizado en las células RPh-1. Fig. 13A, diferenciación inducida con fracción 18,1; Fig. 13B, diferenciación inducida con Fracción 18,2.

60 **Figura 14** muestra la regeneración de la piel en un perro macho Golden Retriever envejecido aquejado de una lesión cutánea asociada con la alopecia después del tratamiento con RPh-1. Fig. 14A, antes del tratamiento; Fig. 14B, después de 2 semanas de tratamiento.

65 **Figura 15** muestra el efecto de RPh-1 en la curación de heridas de heridas sufridas en ratones experimentales como se indica por el tamaño de la herida (mm^2) en diversos puntos temporales después de infligir heridas en ratones tratados con RPh-1 por inyección SC (Grupo A, barras grises), por vía tópica (Grupo B, barras negras) y en ratones tratados con vehículo solo (Grupo C, barras abiertas).

Figura 16 muestra el efecto de RPh-1 en la recuperación de la hipoperfusión cerebral en un modelo de rata demencial vascular, tal como se evaluó mediante el ensayo de laberinto de agua de Morris.

El rendimiento de los animales tratados con RPH-1 (grupo A; barras rayadas), animales tratados con vehículo (grupo B; bares con bandas horizontales) y en animales de control de simulacro (barras llenas) se ensayaron para determinar la frecuencia en la ubicación de la plataforma (Fig. 16A); el tiempo empleado en el área de la plataforma (Fig. 16B.); latencia para encontrar la plataforma (Fig. 16C.); frecuencia en la zona 1 (Fig. 16D.); el tiempo empleado en parte la luz (Fig. 16E.); latencia para encontrar la plataforma (Fig. 16F.); y la velocidad (Fig. 16G).

Figura 17 muestra el efecto de RPh-1 sobre la ganancia de peso.

Figura 17A muestra el aumento de peso en los animales después de la hipoperfusión cerebral en un modelo de rata de la demencia vascular. El peso de los animales del grupo B (tratados con RPh-1; símbolos de triángulo) se está recuperando significativamente más rápidamente que los animales del grupo A (tratados con vehículo; símbolos cuadrados).

Figura 17B muestra el aumento de peso de los ratones obesos (ob/ob) después del tratamiento con RPh-1, ya sea por administración subcutánea (Grupo A; símbolos de diamantes) o por administración tópica (Grupo B; símbolos cuadrados), o el tratamiento con vehículo solo (Grupo C; símbolos triángulo). Los ratones de los grupos B y C ganaron un 10,2% y 9,1%, respectivamente. La tasa de ganancia de peso corporal en todos los grupos expresados por las laderas era similar ($p = 0,07$ (A vs. B), $0,08$ (A vs. C) y $0,43$ (B vs. C)).

Figura 18 muestra el efecto de RPh-1 en la recuperación de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO) en un modelo de carrera de la rata.

Fig. 18A muestra la calificación neuro-muscular (Neuroscore) en varios puntos de tiempo en días (d) como se indica, después de MCAO en ratas tratadas con RPh-1 (Grupo A) o con vehículo (Grupo B). Se observaron diferencias significativas sólo en el Grupo A, entre el día 8 y el día 14, y entre el día 8 y el día 28.

Fig. 18B muestra los resultados de la prueba de paso a paso en varios puntos de tiempo después de MCAO en ratas tratadas con RPh-1 (Grupo A; barras negras) o con vehículo (Grupo B; barras abiertas) de tratamiento. Se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos sólo en el día 28.

Fig. 18C muestra los resultados de la prueba de eliminación de adhesivo en varios puntos de tiempo en días (d) como se indica, después de MCAO en ratas tratadas con RPh-1 (Grupo A) o con vehículo (Grupo B). Se observaron diferencias significativas sólo en el Grupo A, entre el día 2 y los otros días.

Figura 19 muestra el número medio de células ganglionares retinianas (RGC) supervivientes tras axotomía del nervio óptico en ratas tratadas con control y RPh-1.

Figura 20 muestra el análisis Western blot de la expresión de SEMA3 (Fig. 20A) y la caspasa-3 (Fig. 20B) en desprendimiento de retina (DR) y retinas no lesionadas (control) de animales tratados con RPh-1 o vehículo tras desprendimiento de retina.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0063] La presente invención proporciona composiciones que tienen propiedades neuroprotectoras y neuro-regenerativas que son útiles para tratar una variedad de enfermedades y trastornos neurológicos. Más específicamente, las composiciones que comprenden fracciones aisladas extraídas de la goma de masilla están ahora reveladas a tener actividades neuroprotectoras y se pueden utilizar para promover la diferenciación y maduración de los tipos de células neuronales y otros tipos de células.

[0064] Además, se ha encontrado que mirceno polimérico es un componente principal de tales extractos de goma de masilla. La síntesis química y la prueba biológica de mirceno polimérico ha confirmado que este compuesto presenta las actividades biológicas neuroprotectoras y neuro-regenerativas antes mencionadas. Por otra parte, estos resultados son muy inesperados a la luz de la técnica anterior que enseña que la fracción polimérica obtenida a partir de la masilla no tiene ningún beneficio terapéutico, y de hecho obstaculiza ciertas actividades biológicas atribuidas a las preparaciones de masilla cruda y extractos de masilla.

[0065] Se da a conocer en el presente documento por primera vez que, debido a sus diversas actividades en la estimulación e inducción de la regeneración de células, la fracción aislada de la goma de masilla como se describe en el presente documento se puede emplear como ingrediente activo en una composición farmacéutica para un número de indicaciones terapéuticas relacionadas con la alteración de la función neurológica, y las condiciones que requieren la reparación de tejidos. Tras el contacto con células de sujetos tanto humanos como no humanos, la composición induce la diferenciación celular en una amplia gama de tejidos, compartimentos de células y linajes celulares, incluyendo la piel, el endotelio, las membranas mucosas, huesos, tendones y cartílagos. Además, la actividad de diferenciación celular de la composición farmacéutica puede explotarse para promover *in vivo* la incorporación de los dispositivos médicos, implantes y trasplantes de órganos.

Definiciones

[0066] Tal como se usa en el presente documento, los términos "masilla", "resina de masilla", "goma de masilla" y "goma de masilla", se utilizan indistintamente para referirse a una resina de árbol (también conocida como una oleoresina) obtenida como un exudado de cualquier árbol clasificado en la familia de anacardiaceae. Los árboles del género *Pistacia*, más notablemente *Pistacia lentiscus* L., y en particular, el *P. lentiscus* L. cv. Chia cultivar (cultivado en la isla griega de Quíos), se conocen por su alto rendimiento de masilla. Otras variedades incluyen *P. lentiscus* L. var. *emarginata* Engl., y *P. lentiscus* L. var. *latifolia* Coss. Otras especies de *Pistacia* incluyen, por ejemplo, *P. atlantica*, *P. palestina*, *P. saportae*, *P. terebinthus*, *P. vera* y *P. integerrima*.

[0067] Tal como se utiliza aquí, el término "polímero" se refiere a un compuesto o una mezcla de compuestos, que comprende subunidades de repetición (también denominadas monómeros) de la misma estructura química, en el que los monómeros están en conexión covalente. Un ejemplo de un monómero a partir del cual se puede formar un polímero es un terpeno, por ejemplo un monoterpeno tal como mirceno. Los polímeros pueden tener diferentes grados de polimerización y por lo tanto abarcan formas poliméricas de diversa longitud de cadena. Polímeros incluyen homopolímeros y heteropolímeros (también conocidos como copolímeros), y pueden tener diversas configuraciones isoméricas y diastereoisómeras.

[0068] Tal como se usa en el presente documento, los términos "mirceno polimérico" y "polimirceno" de forma intercambiable se refieren a un polímero formado a partir de monómeros de mirceno. Mirceno y polímero abarcan formas poliméricas que tienen diversos grados de polimerización y preferiblemente polímeros de mirceno que tienen un grado de polimerización de al menos 6. Mirceno polimérico para uso de acuerdo con la invención incluye sin limitación, β -mirceno polimérico (poli- β -mirceno), α -mirceno polimérico (poli- α -mirceno), homopolímeros de los mismos, heteropolímeros (también conocidos como copolímeros) que comprenden monómeros de mirceno en conexión covalente directa o indirecta con monómeros heterólogos, isómeros trans- y cis- de los mismos, D- y L-enantiómeros de los mismos, o combinaciones de los mismos. Mirceno polimérico puede obtenerse en forma aislada de una fuente vegetal, en particular de la masilla, o puede ser el producto de una reacción de síntesis química.

[0069] Tal como se utiliza aquí, el término "una fracción aislada de la goma de masilla" se refiere a una fracción obtenida después de la extracción de masilla de goma en al menos un disolvente orgánico polar o no polar, o combinaciones de los mismos. La fracción aislada para uso de acuerdo con la invención es generalmente soluble en uno o ambos de los disolventes orgánicos polares y no polares.

[0070] Tal como se utiliza aquí, el término "una fracción aislada de mirceno polimérico" se refiere a una preparación de mirceno polimérico que tiene un peso molecular definido o rango de peso molecular, que está separado lejos de otros componentes químicos presentes en la fuente de la que el polímero mirceno se aisló, en particular, una mezcla de reacción química o un extracto de la planta.

[0071] Tal como se utiliza aquí, el término "grado de pureza" se refiere al contenido de un compuesto químico especificado en una preparación, expresado como porcentaje en una base de peso por peso del compuesto químico especificado en relación con otros compuestos químicos en la preparación.

[0072] Como se usa en este documento, "homopolímero" se refiere a un polímero que se produce a partir de un único tipo de monómero. Por ejemplo, mirceno polimérico es un homopolímero cuando se produce solamente a partir de monómeros de mirceno, por ejemplo β -mirceno. Un homopolímero también puede ser una mezcla de polímeros producidos a partir del mismo monómero, pero que tiene un grado variable de polimerización es decir, longitud de la cadena. En consecuencia, mirceno polimérico puede comprender una diversidad de compuestos de diferentes longitudes de cadena y diferentes pesos moleculares. Además, un homopolímero puede contener monómeros que tienen diferentes configuraciones isoméricas, por ejemplo, β -mirceno" y α -mirceno.

[0073] Como se usa en este documento, "heteropolímero" y "copolímero" se refieren a un polímero producido a partir de más de un tipo de monómero. Así, por ejemplo, un copolímero de mirceno se produce a partir de monómeros de mirceno, además de un tipo de monómero heterólogo que no es mirceno. Los copolímeros incluyen copolímeros alternantes, copolímeros de periódicos, copolímeros aleatorios, copolímeros de bloque y copolímeros estadísticos, como se conoce en la técnica.

[0074] Como se usa en este documento, "grado de polimerización." se refiere al número de monómeros o unidades monoméricas que están asociadas covalentemente para formar un polímero, por ejemplo, el número de monómeros de mirceno en un compuesto de mirceno polimérico.

[0075] Como se usa en este documento, "peso molecular promedio en peso" se refiere al peso molecular de promedio de un polímero que tiene moléculas de diferentes longitudes de cadena, tal como se expresa por la ecuación:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

5 donde N_i es el número de moléculas de peso molecular M_i . El peso molecular promedio en peso puede determinarse por ejemplo, por dispersión de luz, dispersión de neutrones de ángulo pequeño, dispersión de rayos X, y velocidad de sedimentación.

10 **[0076]** Como se usa en este documento, "peso molecular promedio en número" se refiere al peso molecular de promedio de un polímero que tiene moléculas de diferentes longitudes de cadena, tal como se expresa por la ecuación:

$$15 \quad \bar{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

20 donde N_i es el número de moléculas de peso molecular M_i . El peso molecular promedio en número puede determinarse por ejemplo, mediante cromatografía de permeación en gel (también conocida como cromatografía de exclusión de tamaño) o viscosimetría.

25 **[0077]** Los términos "índice de polidispersidad" y "distribución molecular" se usan en este documento indistintamente para referirse a la relación del peso molecular de promedio en peso al peso molecular promedio en número.

30 **[0078]** Tal como se usa en este documento, "compuestos de terpeno" se refiere a hidrocarburos que contienen isopreno y compuestos relacionados que contienen oxígeno tales como alcoholes, aldehídos o cetonas (terpenoides). La unidad de isopreno ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CH}=\text{CH}_2$) es el bloque de construcción básico de este tipo de compuestos. Hidrocarburos terpénicos en general, tienen la fórmula molecular $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$, e incluyen monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y que tienen, respectivamente, 2, 3, 4, 6 y 8 unidades de isopreno. Los terpenos pueden ser clasificados como acíclico o cíclico.

35 **[0079]** Ejemplos de monoterpenos incluyen mirceno, limoneno y pineno, que son, respectivamente, ejemplos de monoterpenos acíclicos, monocíclicos y bicíclicos. Ejemplos de sesquiterpenos incluyen nerolidol y farnesol. Ejemplos de diterpenos incluyen el cafestol y el fitol. Los ejemplos de un terpeno y un tetraterpeno son escualeno y caroteno, respectivamente.

40 **[0080]** Como se usa en este documento, "sustancialmente libre" significa que una composición o preparación farmacéutica para su uso según la invención contiene generalmente menos de 3% de la sustancia mencionada, preferiblemente menos de 1% y lo más preferiblemente menos de 0,5%.

45 **[0081]** En la presente memoria, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad de un ingrediente farmacéutico que induce sustancialmente, promueve o resulta en un efecto terapéutico deseado.

50 **[0082]** Tal como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente o vehículo que se utiliza para mejorar las propiedades de suministro y/o farmacocinéticas de un ingrediente farmacéutico con el que se formula, pero no tiene un efecto terapéutico propio, ni induce ni causa ningún efecto indeseable o adverso o reacción adversa en el sujeto.

55 **[0083]** Tal como se usa en este documento, "vehículo hidrófobo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente o vehículo no polar hidrófobo en el que se disuelve o suspende el mirceno polimérico.

60 **[0084]** Tal como se usa en este documento, "la diferenciación celular" se refiere al proceso en el que una célula menos especializada se convierte en una célula más especializada. La diferenciación celular se puede establecer sobre la base de los cambios en cualquiera de una serie de características celulares, incluyendo pero no limitado a tamaño, forma, aspecto orgánulo, potencial de membrana, actividad metabólica y capacidad de respuesta a las señales. Un "grado" particular, se puede administrar a un tipo celular para describir el grado de diferenciación.

65 **[0085]** Tal como se usa en este documento, "función neurológica alterada" se refiere a una disminución en al menos una de la función sensorial, cognitiva o motora, en comparación con un nivel anterior de la función o actividad, y/o en comparación con los sujetos no alterados de acuerdo con criterios aceptados.

[0086] Los valores numéricos indicados en la presente memoria han de entenderse como el valor declarado +/- 10%.

Fracciones aisladas de la goma de masilla y mirceno polimérico

[0087] La presente invención emplea fracciones aisladas que comprenden mirceno polimérico. La fracción puede ser de una fuente vegetal, en particular la goma de masilla, o puede ser el producto de una síntesis química. Mirceno polimérico para uso en la invención es un compuesto de polímero, o una mezcla de polímeros de diferentes pesos moleculares, que se forman a partir de subunidades de mirceno. Fuentes vegetales adecuadas de mirceno polimérico incluyen las clasificadas ya sea en la familia anacardiaceae o una familia de plantas diferentes. Las especies de plantas de las que se puede obtener un producto de mirceno polimérico incluyen, sin limitación, las de los géneros *Pistacia*, *Pinus*, *Picea*, *Juniperus*, *Alsies*, *Larix*, *Ocimum*, *Laurus* y *Lavandula*. Especies útiles de *Pistacia* incluyen, sin limitación, *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *P. palestina*, *P. saportae*, *P. terebinthus*, *P. vera* y *P. integerrima*. El mirceno polimérico puede obtenerse de cualquier parte de la planta, incluyendo, por ejemplo, resina, hojas, ramas, frutos y semillas. Una fracción aislada de mirceno polimérico puede obtenerse más convenientemente a partir de la goma de masilla, aunque se pueden usar otras partes y productos vegetales. Varios métodos para la obtención y caracterización de una fracción aislada que comprende mirceno polimérico de la goma de masilla se ejemplifican en los Ejemplos 1 y 2 de este documento. Preparaciones comerciales de masilla están disponibles, por ejemplo, de la Asociación de Productores de Masilla de Goma de Quíos, o de G. Baldwin & Co., Reino Unido

[0088] Alternativamente, mirceno polimérico se puede producir químicamente como un equivalente sintético de un polímero de origen natural, tal como cis-1,4-poliβ-mirceno, o puede ser un polímero mirceno que se produce en la naturaleza, tal como polimérico α-mirceno. La invención no se limita al proceso mediante el cual se produce el mirceno polimérico o si es natural, sintético o semi-sintético.

[0089] Se prevé que el mirceno polimérico puede ser un producto sintético, producido por un proceso químico utilizando como sustrato una forma monomérica del mirceno monoterpene. El sustrato de mirceno monomérico puede aislarse de una planta, o puede ser químicamente o enzimáticamente convertido de un terpeno precursor, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, β-mirceno monomérico aislado de una fuente de la planta se puede polimerizar posteriormente a β-mirceno polimérico por un proceso químico. Cuando el sustrato mirceno se deriva de una fuente natural, el producto resultante puede ser denominado como un producto semi-sintético. Procesos químicos para la polimerización de β-mirceno se describen por ejemplo en la Patente de Estados Unidos nº 4.564.718.; 5.759.569; 7.232.872 y 7.214.750, y en Newmark et al (1988) J. Polymer Sci. 26, 71-77 (1988) y en Cawse et al (1986) Journal of Applied Polymer Science, Vo I. 31, 1963-1975.

[0090] Un proceso de síntesis química adecuada emplea una reacción de polimerización aniónica, por ejemplo, la que comprende el uso de al menos un disolvente alcano o cicloalcano y al menos un metal de alcalino alquilo. Por ejemplo, el metal alcalino alquilo puede ser de litio de butilo, y el disolvente alcano puede ser hexano, o el disolvente puede ser cicloalcano ciclohexano. El disolvente de alcano y el iniciador de metal alcalino alquilo pueden estar presentes en la mezcla de reacción en una proporción de al menos 20:1. La reacción polimerización aniónica puede ser terminada por un compuesto tal como agua, alcohol, oxígeno molecular y dióxido de carbono.

[0091] El procedimiento de síntesis para el 1,4-poliβ-mirceno descrito en esta memoria (Ejemplo 3) es particularmente adecuado para mantenimiento que contiene las diversas actividades biológicas del polímero, tales como la promoción de la diferenciación celular. Se sabe que β-mirceno monomérico se produce en una variedad de plantas, incluyendo árboles de los géneros *Pinus*, *Picea*, *Juniperus*, *Alsies* y *Larix*, y flores de los géneros *Antirrhinum*, *Boswellii*, *Citrus* y *Gynura*.

[0092] Una fracción aislada de mirceno polimérico puede obtenerse como el producto purificado de una reacción de síntesis química, como se ejemplifica en el Ejemplo 3 en el presente documento. Mirceno polimérico químicamente sintetizado puede ser aislado de sustrato sin reaccionar y otros reactivos, analizados y fraccionados adicionalmente según el peso molecular usando métodos de análisis y de separación como se conocen en la técnica. Tales métodos incluyen los que separan las moléculas sobre la base del tamaño, carga o hidrofobicidad, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de gas-líquido (GLC) y combinaciones de las mismas.

[0093] Los métodos de análisis para la determinación de la estructura química precisa del polímero obtenido incluyen la resonancia magnética nuclear (por ejemplo ¹HNMR y ¹³CNMR), viscosimetría, diversos métodos de espectrometría de masas (por ejemplo MALDI-TOF), métodos de combinación tales como cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM), técnicas de dispersión de luz, tales como por ejemplo Multi Angle Laser Light Scattering (MALLS), el análisis de carbono total, espectrofotometría UV-VIS, IR y espectrometría de FT-IR y otros métodos como se conocen en la técnica. Los mismos métodos y enfoques pueden ser utilizados para purificar y caracterizar mirceno polimérico a partir de plantas, como se muestra en el presente documento en el Ejemplo 2.

[0094] Una fracción de mirceno polimérico que es un producto de una síntesis química debe ser sustancialmente desprovista de monómeros de mirceno y formas oligoméricas de mirceno que tienen un grado de polimerización de menos de aproximadamente 6. También se prefiere que el producto aislado sea sustancialmente desprovisto de compuestos de terpeno monoméricos que son solubles en disolventes orgánicos polares.

[0095] Métodos similares se pueden utilizar para la obtención de fracciones aisladas de la goma de masilla y las

fracciones aisladas de mirceno polimérico, cuando el mirceno polimérico se deriva de una fuente de planta, tales como la goma de masilla. A modo de descripción general, el material vegetal recolectado, por ejemplo la goma de masilla, se combina en un recipiente adecuado con un disolvente adecuado, normalmente un disolvente polar. Los disolventes polares adecuados incluyen, por ejemplo, alcoholes, éteres, ésteres, amidas, aldehídos, cetonas, nitrilos y combinaciones de los mismos. Ejemplos particulares de disolventes orgánicos polares son metanol, etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, sec-butanol, t-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, neopentanol, 3-metilo 1-butanol, 2-metilo-1-butanol, 3-metilo-2-butanol, 2-metilo-2-butanol, etilenglicol, éter monometílico de etilenglicol, éter dietílico, éter metilo, éter etilpropilo, éter metilpropilo, 1,2-dimetoxietano, tetrahidrofurano, dihidrofurano, furano, pirano, dihidropirano, tetrahidropirano, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetaldehído, metilformato, formiato de etilo, propionato de etilo, propionato de metilo, diclorometano, cloroformo, dimetilformamida, acetamida, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, acetona, etilmetilcetona, dietilcetona, acetonitrilo, propionitrilo, y combinaciones de los mismos.

[0096] La goma de masilla y el disolvente se combinan preferiblemente de modo que el disolvente es en gran exceso, por ejemplo 10: 1 o 20: 1. La mezcla se puede agitar periódicamente o continuamente durante un período que varía desde unos pocos minutos a varias horas. El disolvente puede ser decantado sin ningún tratamiento, o, opcionalmente, la mezcla se puede someter primero a centrifugación a baja velocidad, por ejemplo de 100 a 2000 rpm, como se conoce en la técnica. El material insoluble se recupera a partir del extracto y se añade una parte alícuota fresca de disolvente con el material insoluble, de manera que el proceso de extracción y la disolución se repite para un número de ciclos, a fin de obtener lo más posible de los compuestos solubles en disolventes polares. Después de la etapa de disolución final, los extractos que contienen el material soluble en el disolvente polar se combinan y se evapora el disolvente polar (por ejemplo mediante el uso de una evaporación rotatoria como se conoce en la técnica), con el fin de producir material soluble disolvente polar, que se puede denominar como un extracto crudo o de "primer paso".

[0097] El primer material de extracto de paso se combina con un disolvente orgánico no polar y se extrajo por agitación durante un período de 1 hora. Los disolventes no polares adecuados incluyen hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos acíclicos o cíclicos, saturados o insaturados, por ejemplo, alcanos C5-C10, cicloalcanos C5-C10, hidrocarburos aromáticos C6-C14, y combinaciones de los mismos. Cada uno de los anteriores puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, por ejemplo, perfluoroalcanos C7-C14. Ejemplos particulares de disolventes orgánicos no polares son pentanos, hexanos, heptanos, octanos, nonanos, decanos, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, benceno, tolueno, xileno, e isómeros y mezclas de los mismos.

[0098] El material restante insoluble o precipitante en presencia del disolvente no polar se retira y desecha. La fracción soluble en disolvente no polar se obtiene entonces por evaporación del disolvente no polar (por ejemplo por evaporación rotatoria). Esta fracción denominarse extracto purificado o de "dos etapas", que corresponde a una fracción aislada de la goma de masilla que se caracteriza por el hecho de que es soluble tanto en un disolvente polar como en un disolvente no polar, mientras que los materiales que son solubles en el disolvente polar pero insolubles en el disolvente no polar, se han eliminado. Esta característica distingue las fracciones aisladas para el uso según la invención sobre los extractos de la técnica anterior de la goma de masilla, el último de los cuales generalmente incluye una amplia variedad de compuestos que son solubles sólo en disolventes polares. De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, tales compuestos interfieren con las actividades biológicas beneficiosas de las fracciones aisladas descritas en este documento.

[0099] El extracto de dos etapas puede secarse adicionalmente, por ejemplo mediante tratamiento de alto vacío (por ejemplo, <0,01 mbar de hasta varios días) para eliminar el disolvente residual y otros materiales volátiles, pesarse y combinarse con un disolvente orgánico polar no adecuado u otro vehículo para efectuar su disolución. Como se describe aquí en los Ejemplos 1 y 2, estas fracciones aisladas contienen mirceno polimérico. Las fracciones obtenidas que contienen mirceno polimérico se pueden usar directamente o adicionalmente purificarse, caracterizarse y/o fraccionarse usando medios conocidos en la técnica, como se especifica anteriormente.

[0100] Fracciones aisladas se pueden obtener por un procedimiento que comprende las etapas de:

(a) tratar la goma de masilla con un disolvente orgánico polar;

(b) aislar una fracción soluble en dicho disolvente orgánico polar;

(c) eliminar opcionalmente dicho disolvente orgánico polar;

(d) tratar la fracción soluble obtenida en la etapa (b) o (c) con un disolvente orgánico no polar, (e) aislar una fracción soluble en dicho disolvente orgánico no polar; y

(f) retirar opcionalmente dicho disolvente orgánico no polar;

que las etapas (d) a (f) pueden preceder a los pasos (a) a (c).

[0101] El procedimiento puede comprender además el tamaño de fraccionamiento de la fracción soluble obtenida después de la etapa (c) o la etapa (f), por ejemplo por cromatografía de exclusión de tamaño, o cualquier otro método conocido en la técnica.

5 [0102] El procedimiento puede comprender además la eliminación del disolvente después de que cualquiera o ambas de las etapas (c) o (f). La eliminación del disolvente puede llevarse a cabo por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo evaporación rotativa, la aplicación de alto vacío y una combinación de los mismos. Las etapas (a) a (c) pueden llevarse a cabo antes de las etapas (d) a (f), o viceversa. El disolvente orgánico polar puede comprender etanol y el disolvente orgánico no polar comprende hexano. Como se entiende fácilmente por un experto en la técnica, las etapas (a) a (c) y las etapas (d) a (f) se pueden llevar a cabo de forma independiente por un número de ciclos para optimizar el proceso de extracción y el grado de purificación del producto.

10 [0103] Para la preparación de una composición para uso terapéutico, los vehículos adecuados se pueden usar, tales como vehículos hidrófobos incluidos los aceites farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en combinación con ceras, como se describe en el presente documento.

15 [0104] Las composiciones que comprenden las fracciones aisladas a partir de la goma de masilla como se describe aquí, deben comprender menos de aproximadamente 20% (en peso) de los compuestos de terpeno monómeros y oligómeros que son solubles en el disolvente orgánico polar y que son sustancialmente insolubles en el disolvente orgánico no polar, en el que los disolventes antes mencionados se refieren a los utilizados en la preparación de la fracción. Más preferiblemente, las fracciones aisladas comprenden menos de aproximadamente 5% (en peso) de tales compuestos de terpeno. Incluso más preferiblemente, las fracciones aisladas son sustancialmente desprovistas de tales compuestos de terpeno. Los efectos inhibidores de las fracciones que comprenden tales compuestos de bajo peso molecular en la actividad biológica de mirceno polimérico se ejemplifican en este documento en el Ejemplo 8.

20 [0105] Una fracción aislada que comprende mirceno polimérico puede derivarse de una planta y puede ser sustancialmente desprovista de monómeros de mirceno y formas oligoméricas de mirceno que tienen un grado de polimerización de menos de 6. Una fracción aislada que comprende mirceno polimérico puede derivarse de una planta y puede ser sustancialmente desprovista de compuestos de terpeno que son solubles en un disolvente orgánico polar, pero son sustancialmente insolubles en un disolvente orgánico no polar.

25 [0106] Se ha de entender que el mirceno polimérico puede no tener un peso molecular único, sino más bien, una distribución de pesos moleculares, que representa una población de moléculas de mirceno poliméricas de diferente grado de longitud de cadena, es decir de polimerización.

30 [0107] No hay un límite superior particular sobre el peso molecular o el grado de polimerización del mirceno polimérico. El grado de polimerización puede ser al menos aproximadamente 6. El grado de polimerización puede ser al menos aproximadamente 10. El grado de polimerización puede ser al menos aproximadamente 25. El grado de polimerización puede ser al menos aproximadamente 35. El mirceno polimérico puede tener un grado de polimerización en el intervalo de al menos aproximadamente 6 a aproximadamente 1800. Los intervalos ejemplares adecuados incluye aproximadamente 30 a aproximadamente 500, o aproximadamente 35 a aproximadamente 150.

35 [0108] El peso molecular promedio en número del mirceno polimérico es preferiblemente al menos aproximadamente 800. Más preferiblemente, el peso molecular promedio en número es de al menos 1000, tal como al menos 2000 o al menos 3000, y aún más preferiblemente, el peso molecular promedio en número es al menos aproximadamente 5000. El mirceno polimérico puede tener un peso molecular promedio en número en el intervalo de al menos aproximadamente 800 a aproximadamente 100.000. El peso molecular promedio en número puede ser de un rango seleccionado de entre el grupo que consiste en: al menos aproximadamente 800 a aproximadamente 5.000; al menos aproximadamente 800 a aproximadamente 15.000; aproximadamente 5.000 a aproximadamente 15.000; aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000; aproximadamente 15.000 a aproximadamente 30.000; aproximadamente 25.000 a aproximadamente 40.000; aproximadamente 35.000 a aproximadamente 50.000; aproximadamente 45.000 a aproximadamente 60.000; aproximadamente 55.000 a aproximadamente 70.000; aproximadamente 65.000 a aproximadamente 80.000; aproximadamente 75.000 a aproximadamente 90.000; aproximadamente 85.000 a aproximadamente 100.000; y sus combinaciones. El peso molecular promedio en número puede ser de al menos aproximadamente 5000. El mirceno polimérico puede tener un peso molecular promedio en números en el intervalo de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000. Es de entenderse que la composición puede comprender diferentes fracciones de peso molecular de mirceno polimérico, por ejemplo en el intervalo de al menos aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000, así como en el intervalo de aproximadamente 25.000 a aproximadamente 40.000. El mirceno polimérico puede tener una distribución molecular de menos de 5.

40 [0109] La fracción aislada puede consistir esencialmente de mirceno polimérico que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000.

45 [0110] El peso molecular del producto polimérico se puede expresar de una variedad de maneras, por ejemplo, el

peso molecular promedio en peso molecular promedio en peso o número, como se conoce en la técnica. El peso molecular puede determinarse por cualquiera de una serie de medios, tales como la dispersión de la luz, multi dispersión de luz láser de ángulo (centros comerciales), pequeño ángulo de dispersión de neutrones, dispersión de rayos X, velocidad de sedimentación, viscosimetría (ecuación de Mark-Houwink), espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF) y cromatografía de permeación en gel.

[0111] El mirceno polimérico puede existir como diferentes isómeros geométricos, resultando de la disposición de los sustituyentes alrededor del doble enlace carbono-carbono. Tales isómeros se designan como cis o configuración trans- (también se hace referencia, respectivamente, como la Z o E de configuración), en el que cis- (o Z) representa sustituyentes en el mismo lado del doble enlace carbono-carbono, y trans- (o E) representa sustituyentes en lados opuestos del doble enlace carbono-carbono. Los diversos isómeros geométricos y mezclas de los mismos son útiles en la invención.

[0112] El producto mirceno polimérico puede contener uno o más átomos de carbono asimétricos y por lo tanto puede presentar isomería y/o diastereoisomería óptica. Todos los estereoisómeros y diastereoisómeros son útiles en la invención, ya sea como un único isómero o como una mezcla de formas isoméricas estereoquímicas. Los diversos estereoisómeros y diastereoisómeros se pueden separar usando técnicas convencionales, por ejemplo cromatografía o cristalización fraccionada. Alternativamente los isómeros ópticos deseados se pueden preparar por reacción de los materiales de partida ópticamente activos apropiados en condiciones que no causan racemización o epimerización, o por derivatización, por ejemplo con un ácido homoquiral seguido de separación de los derivados diastereoméricos por medios convencionales.

[0113] Las formas adecuadas de mirceno polimérico incluyen β -mirceno polimérico (poli- β -mirceno), incluyendo 1,4-poli- β -mirceno, 3,4-poli- β -mirceno, 1,2-poli- β -mirceno, cis-1,4-poli- β -mirceno, trans-1,4-poli- β -mirceno, α -mirceno polimérico (poli- α -mirceno) o combinaciones de los mismos. El aislamiento y la caracterización de 1,4-poli- β -mirceno de masilla se describen por ejemplo en Van der Berg et al (1998) Tetrahedron Lett 3: 2645-2648.

[0114] El mirceno polimérico puede tener una conformación lineal, una conformación ramificada o una conformación cíclica.

[0115] La fracción aislada de mirceno polimérico útil de acuerdo con la invención tiene un grado de pureza de al menos 90%, tal como al menos 93%, o al menos 95%, o al menos 97%, o al menos 98% o al menos 99%. Como se entiende en la técnica, se desea un grado de pureza tan alto como sea posible *inter alia* para garantizar el cumplimiento con requisitos de agencia reguladora de la salud. Se ha de entender sin embargo, que la fracción de mirceno polimérico puede contener especies poliméricas de mirceno que tienen diversos pesos moleculares, tales como dentro de un rango estrecho o amplio definido, sin reducir el grado específico de pureza. Además, la fracción aislada de mirceno polimérico puede contener diferentes isómeros estructurales como se describe anteriormente de mirceno polimérico sin reducir el grado específico de pureza. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos 90% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender una mezcla de cis-1,4-poli- β -mirceno y trans-1,4-poli- β -mirceno, en el que la mezcla comprende al menos 80% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos 90% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número de al menos 800. El peso molecular promedio en número puede ser al menos 1,000. El peso molecular de promedio puede ser de al menos 2000. El peso molecular de promedio en número puede ser de al menos 3,000. El peso molecular promedio en número puede ser de al menos 5000. El peso molecular promedio en número puede ser de al menos 10.000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos 90% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular de promedio en número en el intervalo de aproximadamente 800 a aproximadamente 5000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos 90% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos 90% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular de promedio en número en el intervalo de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 20.000. La fracción aislada de mirceno polimérico ne puede comprender al menos 90% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular de promedio en número en el intervalo de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000. La fracción aislada del mirceno polimérico puede consistir esencialmente en cis-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular de promedio en número en el intervalo de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000.

[0116] La fracción aislada de mirceno polimérico puede tener un grado de pureza de al menos 90%, y el mirceno polimérico tiene un grado de polimerización de al menos 10.

[0117] La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos 90% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular de promedio en número en el intervalo de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 30.000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos 90% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular de promedio en número en el intervalo de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 50.000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos 90% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular de promedio en número en el intervalo de

aproximadamente 50.000 a aproximadamente 80.000.

[0118] La fracción aislada de mirceno polimérico se puede purificar sustancialmente de compuestos de terpeno que son solubles en un disolvente orgánico polar pero sustancialmente insoluble en un disolvente orgánico no polar. En particular, la composición debe comprender menos de aproximadamente 10% (en peso), y más preferiblemente, menos de aproximadamente 5% (en peso), y más preferiblemente, menos de aproximadamente 3% (en peso), de compuestos de terpeno que son solubles en un disolvente orgánico polar, pero sustancialmente insolubles en un disolvente orgánico no polar. La composición puede comprender menos de aproximadamente 10% (en peso), y más preferiblemente menos de aproximadamente 5% (en peso), y más preferiblemente, menos de aproximadamente 3% (en peso), de compuestos de terpeno monoméricos. La composición puede estar sustancialmente desprovista de monómeros de mirceno y formas oligoméricas de mirceno que tienen un grado de polimerización de menos de aproximadamente 5. La composición puede comprender menos de aproximadamente 10% (en peso), y más preferiblemente, menos de aproximadamente 5% (en peso), y más preferiblemente, menos de aproximadamente 3% (en peso), de un compuesto de terpeno seleccionado de entre el grupo que consiste en: β -mirceno, α -mirceno, cis- α -ocimeno, dihidromirceno, limoneno, α -pineno, β -pineno, y combinaciones de los mismos.

Composiciones farmacéuticas

[0119] La composición para su uso en la invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una fracción aislada de mirceno polimérico, y un vehículo hidrófobo farmacéuticamente aceptable.

[0120] Un vehículo hidrofóbico adecuado comprende al menos un aceite, tal como por ejemplo un aceite mineral, un aceite vegetal o combinaciones de los mismos.

[0121] El término "aceite mineral" se refiere a un líquido transparente e incoloro, casi inodoro e insípido obtenido de la destilación del petróleo. También puede denominarse aceite blanco, aceite mineral blanco, aceite de vaselina, parafina líquida o aceite de parafina blanco. El aceite mineral puede ser aceite mineral ligero, un producto disponible comercialmente que se puede obtener ya sea como un producto de grado NF (National Formulary) o como un producto de grado USP (Farmacopea de EE.UU.). Para uso en la invención, el aceite mineral está preferiblemente libre de compuestos aromáticos y compuestos insaturados.

[0122] Los aceites vegetales adecuados incluyen, pero no se limitan a aceite de almendras, aceite de canola, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de uva, aceite de cacahuate, aceite de oliva, aceite de azafrán, aceite de sésamo, aceite de soja, o combinaciones de los mismos. El aceite mineral puede ser aceite mineral ligero.

[0123] El vehículo farmacéuticamente aceptable puede comprender alternativamente o adicionalmente un cambio de aceite adecuado. Reemplazos de aceite incluyen alcanos que tienen al menos 10 de carbono (por ejemplo, isohexadecano), ésteres de benzoato, ésteres alifáticos, ésteres no comodogénicos, compuestos de silicona volátiles (por ejemplo, ciclometicona) y sustitutos de silicona volátiles. Ejemplos de ésteres de benzoato incluyen benzoato de alquilo C₁₂C₁₅, benzoato de isoestearilo, benzoato de 2-etilhexilo, benzoato de dipropilenglicol glicol, benzoato de octildodecilo, benzoato de estearilo y benzoato de behenilo. Ejemplos de ésteres alifáticos incluyen C₁₂C₁₅ alquilo octanoato y maleato de dioctilo. Los ejemplos de ésteres noncomodogénicos incluyen isononanoato de isononilo, isononanoato de isodecilo, dilinoleato dímero diisoestearilo, propionato araquidílico, y isotridecilisononanoato. Ejemplos de sustitutos de silicona volátiles incluyen decanoato de isohexilo, isononanoato de octilo, octanoato de isononilo y dioctanoato de dietilenglicol.

[0124] La ciclometicona es una silicona de evaporación que se puede incluir en el vehículo para ayudar en la toma de la composición susceptible de eyección de un dispensador de pulverización. Además, debido a su propiedad de evaporación, ciclometicona puede ayudar en la retención y la fijación de la formulación sobre la superficie a la que se pulveriza, por ejemplo, un sitio de la herida.

[0125] El vehículo hidrófobo puede comprender además al menos una cera. Las ceras incluyen, por ejemplo, cera de abejas; ceras vegetales, ceras de caña de azúcar, ceras minerales y ceras sintéticas. Ceras vegetales incluyen, por ejemplo, carnauba, candelilla, ouricuri y cera de jojoba. Ceras minerales incluyen, por ejemplo, cera de parafina, cera de lignito, ceras microcristalinas y las ozoqueritas. Las ceras sintéticas incluyen, por ejemplo, polietileno de ceras.

[0126] La composición farmacéutica se puede formular en cualquiera de una serie de formas tales como, por ejemplo, una cápsula (incluyendo una cápsula de gelatina blanda), un comprimido, un gel, un liposoma, un supositorio, una suspensión, una pomada, una solución, una emulsión o microemulsión, una película, un cemento, un polvo, un pegamento, un aerosol, un spray y un gel.

[0127] Para la preparación de la composición farmacéutica, el mirceno polimérico puede formularse adecuadamente

como complejos de inclusión, nanoemulsiones, microemulsiones, polvos y liposomas. Un complejo de inclusión puede comprender al menos una ciclodextrina. Las ciclodextrinas pueden comprender hidroxipropilo- β -ciclodextrina. Nanoemulsiones pueden comprender gotitas que tienen tamaño medio de partícula inferior a 800 nm. Las gotitas pueden tener un tamaño medio de partícula de menos de 500 nm. Las gotitas pueden tener un tamaño de partícula promedio de menos de 200 nm. Los polvos pueden ser polvos secados por pulverización. Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares. Una microemulsión puede comprender un agente tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos incluyen, sin limitación, aceites de ricino de polioxilo, ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno (polisorbatos), un poloxámero, derivados de vitamina E, éteres de alquilo de polioxietileno, estearatos de polioxietileno, glicéridos poliglicolizados saturados o combinaciones de los mismos.

[0128] Varias formulaciones de mirceno polimérico y preparación de los mismos se dan a conocer en el presente documento en los Ejemplos 17-21. Las composiciones farmacéuticas descritas se pueden administrar por cualquier medio que consiga su propósito previsto. Por ejemplo, la administración puede ser por vía oral, parenteral, tópica o transdérmica. La administración parenteral incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, intrauterina, intrauretral, intracardial, intracerebral, intracerebroventricular, intrarrenal, intrahepática, intratendon, intraósea e intratecal de la administración. La administración tópica incluye la aplicación a través de una ruta seleccionada de dérmica, vaginal, rectal, inhalación, intranasal, ocular, auricular y bucal. La administración puede además comprender una técnica o medios tales como la electroporación, o la sonicación con el fin de ayudar en su entrega, por ejemplo por vía transdérmica. Otras técnicas que se pueden emplear incluyen, por ejemplo, la frecuencia de radio o la aplicación por pulverización a presión.

[0129] La dosificación administrada dependerá de la edad, salud, y peso del sujeto, el uso de tratamiento concurrente, si lo hay, frecuencia de tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado. La cantidad del mirceno polimérico para su uso de acuerdo con la presente invención en cualquier forma de dosificación unitaria comprende una cantidad terapéuticamente eficaz que puede variar dependiendo del sujeto receptor, la vía y la frecuencia de administración.

[0130] En general, la cantidad de mirceno polimérico o fracción de goma de masilla aislada presente en la composición farmacéutica puede estar convenientemente en el intervalo de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 25%, tal como 0,01% a aproximadamente 12%, en un peso por peso base, basado en el peso total de la composición. Para uso tópico, el porcentaje de mirceno polimérico o fracción de goma de masilla aislada en la composición puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 2,5%. Para la administración por inyección, el porcentaje de mirceno polimérico o fracción de goma de masilla aislada en la composición puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 7%. Para la administración oral, el porcentaje de mirceno polimérico o fracción de goma de masilla aislada en la composición puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 7%.

[0131] Las composiciones farmacéuticas descritas se pueden fabricar de una manera que en sí mismo se conoce por los expertos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, granulación, elaboración de grageas, encapsulación de gelatina blanda, disolución, extracción, o liofilización. Las formulaciones pueden ser no acuosas y/o no comprender disolventes polares que contactan directamente con el ingrediente activo polimérico de mirceno, a fin de evitar la pérdida de la actividad biológica del ingrediente activo. Así, las composiciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener combinando los compuestos activos con excipientes sólidos y semi-sólidos y conservantes adecuados, y/o antioxidantes. Opcionalmente, la mezcla resultante puede ser molida y procesada. La mezcla resultante de los gránulos se puede utilizar, después de añadir auxiliares adecuados, si es necesario, para obtener comprimidos, geles blandos, cápsulas, o núcleos de grageas.

[0132] Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como sacarinas, por ejemplo, lactosa o sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa y/o fosfatos de calcio, por ejemplo, fosfato tricálcico o fosfato hidrógeno de calcio; así como aglutinantes, tales como pasta de almidón, usando, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o pirrolidona de polivinilo. Si se desea, agentes desintegrantes pueden añadirse, tales como los almidones mencionados anteriormente y también carboximetilo-almidón, polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Auxiliares son agentes reguladores del flujo y lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico o sales del mismo, tales como estearato de magnesio o estearato de calcio, y/o polietilenglicol. Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados que, si se desea, son resistentes a los jugos gástricos. Para este propósito, las soluciones concentradas de sacarina se pueden usar, que pueden contener opcionalmente goma árabe, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Con el fin de producir recubrimientos resistentes a los jugos gástricos, soluciones de preparaciones de celulosa adecuadas, tales como ftalato de acetilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa de celulosa, se utilizan. Colorantes o pigmentos pueden añadirse a los comprimidos o revestimientos de grageas, por ejemplo, para identificación o para caracterizar combinaciones de dosis de compuestos activos.

[0133] Otras composiciones farmacéuticas para uso oral incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas

duras pueden contener compuestos activos en forma de gránulos, que pueden mezclarse con cargas, tales como lactosa; aglutinantes, tales como almidones; y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se disuelven o suspenden en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, o parafina líquida. Además, se pueden añadir estabilizantes.

5 **[0134]** Otras composiciones farmacéuticas para uso oral incluyen una película diseñada para adherirse a la mucosa oral, como se describe por ejemplo en la Patente de EE.UU. Nº 4.713.243.; 5.948.430; 6.177.096; 6.284.264; 6.592.887, y 6.709.671.

10 **[0135]** Las composiciones farmacéuticas en forma de supositorios consisten en una combinación del compuesto activo con una base de supositorio. Bases para supositorios adecuadas son, por ejemplo, triglicéridos naturales o sintéticos, polietilenglicoles, o hidrocarburos parafínicos.

15 **[0136]** Las formulaciones para administración parenteral incluyen suspensiones y dispersiones de micropartículas de los compuestos activos, según proceda. Las suspensiones de inyección oleosas se pueden administrar. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo, triglicéridos, polietilenglicol-400, cremofor, o ciclodextrinas. Las suspensiones para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyen, por ejemplo, celulosa de carboximetilo de sodio, sorbitol, y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes.

20 **[0137]** Las composiciones farmacéuticas también se pueden preparar usando liposomas que comprenden el ingrediente activo. Como se conoce en la técnica, los liposomas derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono- o multi-laminares que se dispersan en un medio acuoso. Cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas puede utilizarse. En general, los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica, como se describe por ejemplo, en Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, NY (1976) y en la Patente de EE.UU. nº 7.048.943.

30 **[0138]** Las formulaciones para la administración tópica incluyen ungüentos. Los vehículos adecuados incluyen aceites vegetales o minerales, vaselina blanca, grasas de cadena ramificada o aceites, grasas animales y ceras. Los vehículos preferidos son aquellos en los que el ingrediente activo es soluble. Estabilizantes, humectantes y antioxidantes también pueden incluirse, así como agentes que imparten color o fragancia, si se desea. Los ungüentos se pueden formular por ejemplo, mezclando una solución del ingrediente activo en un aceite vegetal tal como aceite de almendra con una parafina blanda caliente, y dejando que la mezcla se enfríe.

35 **[0139]** La composición farmacéutica puede comprender una emulsión o microemulsión de aceite en agua con el fin de facilitar su formulación para uso oral, parenteral o tópica. Tales emulsiones/microemulsiones incluyen generalmente lípidos, tensioactivos, humectantes opcionalmente, y agua. Los lípidos adecuados incluyen los que generalmente se sabe que son útiles para la creación de aceite en agua de emulsiones/microemulsiones, por ejemplo, ésteres de glicéridos de ácidos grasos. Los tensioactivos adecuados incluyen aquellos generalmente conocidos por ser útiles para la creación de emulsiones/microemulsiones de aceite-en-agua en el que los lípidos son usados como el componente de aceite en la emulsión. Los tensioactivos no iónicos pueden ser preferidos, tales como, por ejemplo, aceite de ricino etoxilado, fosfolípidos, y copolímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno. Los humectantes adecuados, si se usan, incluyen, por ejemplo, propilenglicol o polietilenglicol.

40 **[0140]** La composición farmacéutica se puede formular en la forma de un gel, tal como un hidrogel formado a partir de un polímero formador de gel, tales como carragenano, goma de xantano, goma de karaya, goma de acacia, goma de algarroba, goma guar. Un hidrogel se puede combinar con una emulsión de aceite en agua que comprende el ingrediente activo.

45 **[0141]** La composición farmacéutica puede formularse en la forma de un cemento tales como los que comprenden polimetilmetacrilato (PMMA) o fosfato de calcio, como se utilizan en la cirugía ortopédica.

50 **[0142]** La composición farmacéutica puede formularse en forma de un polvo, en particular, tales como los utilizados para aplicaciones transdérmicas utilizando radiofrecuencia, como se describe por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. Nºs. 6.074.688 y 6.319.541 y WO 2006/003659.

55 **[0143]** La composición farmacéutica puede formularse en forma de una cola, tales como los que comprenden anoacrylate octocyl- utilizado para aplicaciones de cierre de heridas.

60 **[0144]** La composición farmacéutica puede estar sustancialmente desprovista de compuestos de terpeno de peso molecular bajo y monomérico, incluyendo por ejemplo, los clasificados como monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, tetraterpenos. Ejemplos de compuestos terpénicos incluyen β -mirceno, α -mirceno, cis- α -ocimeno, dihidromirceno, limoneno, α -pineno, β -pineno, tirucalol, ácido betulonal, ácido masilladienónico, ácido

65

masilladienol, ácido isomasilladienónico, ácido isomasilladienólico, ácido oleanólico y ácido oleanónico.

Usos terapéuticos

- 5 **[0145]** La presente invención encuentra uso en métodos terapéuticos para tratar trastornos de la función neurológica, y la inducción o la promoción de la regeneración de tejidos. Los métodos comprenden la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una fracción aislada de la goma de masilla, o una fracción aislada de mirceno polimérico, como se describe en el presente documento.
- 10 **[0146]** La etapa de administración de las composiciones pueden comprender cualquier ruta aceptable, incluyendo la oral, tópica, parenteral, y transdérmica. La administración parenteral incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, intrauterina, intrauretral, intracardial, intracerebral, intracerebroventricular, intrarrenal, intrahepática, intratendon, intraósea y intratecal. La administración tópica incluye la aplicación a través de una ruta seleccionada de dérmica, vaginal, rectal, inhalación, intranasal, ocular, bucal y auricular.
- 15 **[0147]** La etapa de administración puede comprender la puesta en contacto de las células de un tipo particular, de un linaje particular o en una etapa particular de la diferenciación, con la composición. Las células pueden ser cualquiera de una amplia variedad de tipos de células, incluso en células particulares, neurales, células neuronales, células endoteliales, células epiteliales y células de dichos linajes madre. Además, las células pueden ser de cualquier linaje, por ejemplo, linajes ectodérmicos, mesodérmicos, entodérmicos y células de dichos linajes madre.
- 20 **[0148]** El método descrito en este documento para el tratamiento de deterioro de la función neurológica es particularmente ventajoso para los sujetos afligidos con enfermedades neurodegenerativas y enfermedades, incluyendo, en particular, el trauma, la demencia vascular, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple), accidente cerebrovascular y la enfermedad de Parkinson. En otros casos, el método se puede aplicar ventajosamente en sujetos que sufren de trastornos de la función neurológica debido a una infección (por ejemplo, viral, bacteriana, fúngica, parasitaria) o un trastorno inmunológico. La función neurológica alterada puede deberse a la exposición a un fármaco, tal como un anestésico. La función neurológica alterada también puede estar asociada con una afección seleccionada del grupo que consiste en esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, obesidad, anorexia y caquexia.
- 25 **[0149]** Los métodos descritos en este documento para inducir o promover la regeneración de tejidos son particularmente ventajosos para los sujetos que tienen daño en los tejidos, que por ejemplo, pueden estar asociados con, o el resultado de una lesión o insulto. Los métodos para inducir o promover la regeneración de los tejidos se pueden utilizar en los sujetos que han sufrido una lesión o insulto seleccionado del grupo que consiste de un infarto de miocardio, embolia pulmonar, un infarto cerebral, enfermedad oclusiva arterial periférica, una hernia, un infarto esplénico, una úlcera venosa, una axotomía, un desprendimiento de retina, una herida (por ejemplo, una herida por quemadura, picadura de la herida, una herida de congelación, una herida por punción, una herida de metralla, una contusión, una herida de infección o una herida quirúrgica), una infección y un procedimiento quirúrgico.
- 30 **[0150]** Los métodos descritos se ejemplifican en los Ejemplos descritos en este documento.
- 35 **[0151]** Ejemplo 4 da a conocer que una fracción aislada de mirceno polimérico (derivado de masilla de *Pistacia*) induce diferenciación de las células del epitelio pigmentario de la retina.
- 40 **[0152]** Ejemplo 5 describe que mirceno polimérico reduce el tiempo de recuperación de la anestesia en animales de experimentación.
- 45 **[0153]** Ejemplo 6 describe que la misma fracción tiene una actividad para inducir la diferenciación en el melanoma y líneas celulares de tumores de neuroblastoma.
- 50 **[0154]** Ejemplo 7 describe que mirceno polimérico químicamente sintetizado de diversos intervalos de peso molecular induce diferenciación en las células del epitelio pigmentario de la retina.
- 55 **[0155]** Ejemplo 8 da a conocer que los compuestos de peso molecular pequeño de masilla que se separan de mirceno polimérico durante la preparación de los mismos sobre la base de su solubilidad sólo en un disolvente polar interfieren con, reducen y dificultan la diferenciación celular, induciendo la actividad ejercida por mirceno polimérico.
- 60 **[0156]** Ejemplos 9, 10 y 11 dan a conocer la cicatrización de heridas en mamíferos y sujetos no mamíferos.
- [0157]** Ejemplo 12 describe que las composiciones que comprenden mirceno polimérico tienen efectos de mejora en un modelo animal de la demencia vascular.
- 65 **[0158]** Ejemplo 13 da a conocer una composición que se puede utilizar para estimular el apetito en los sujetos afectados por diversos trastornos que resultan en la pérdida de apetito o aumento de peso patológico resulta en la

obesidad.

[0159] Ejemplo 14 describe que las composiciones que comprenden mirceno polimérico tiene efectos de mejora en un modelo animal de infarto.

[0160] Ejemplo 15 describe que las composiciones que comprenden mirceno polimérico tiene efectos de mejora en un modelo animal de lesión del nervio óptico/trauma.

[0161] Ejemplo 16 describe que las composiciones que comprenden mirceno polimérico tiene efectos en un modelo animal de desprendimiento de retina y proporciona evidencia de la reparación de heridas libre de cicatrices.

[0162] La etapa de poner en contacto células puede llevarse a cabo *in vitro* o *ex vivo*. En particular, las células, o un órgano o tejido derivados de los mismos que está destinado para la implantación o el trasplante en el sujeto puede tratarse. Por ejemplo, los explantes de células o células o tejidos cultivados y mantenidos en cultivo pueden ponerse en contacto con la composición. Las células pueden originarse por ejemplo, de células madre de un donante autólogo u homólogo, y estar previstas para la regeneración de órganos y/o implantación en un receptor. En otros casos, las células son de un donante heterólogo y están destinadas a la implantación o el trasplante en un receptor. Las células pueden ser las de un órgano o tejido de un donante heterólogo destinado a su implantación o el trasplante en un receptor. Las células pueden ser las que secretan factores solubles.

[0163] El método puede llevarse a cabo antes o después de la implantación de un dispositivo médico en el tema. Los dispositivos médicos incluyen, pero no se limitan a una prótesis, un órgano o un componente artificial del mismo, una válvula, un catéter, un tubo, un stent, una membrana artificial, un marcapasos, un sensor, un endoscopio, un dispositivo de imagen, una bomba, un alambre y un implante. Los implantes incluyen, pero no se limitan a un implante cardíaco, un implante coclear, un implante de córnea, un implante craneal, un implante dental, un implante maxilofacial, un implante de órgano, un implante ortopédico, un implante vascular, un implante intra-articular y un implante mamario.

[0164] El dispositivo médico puede ser un implante de órganos, que pueden en ciertos casos comprender células autólogas de la materia.

[0165] La etapa de puesta en contacto puede comprender un medio seleccionado del grupo que consiste en electroporación, sonicación, frecuencia de radio, pulverización a presión y combinaciones de los mismos.

[0166] La etapa de puesta en contacto puede comprender el establecimiento de contacto entre el fluido intersticial y la composición. Esto puede ser particularmente ventajoso para las heridas que están rodeadas por el fluido intersticial. El contacto entre el líquido intersticial y la composición puede llevarse a cabo por la perforación y/o tratamiento de la dermis con una aguja, una microaguja, o un aparato que comprende una pluralidad de agujas o microagujas. Tales agujas o microagujas son preferiblemente no huecas y pueden estar formadas en una pluralidad por ejemplo, en un peine o un aparato similar a un cepillo.

[0167] El método descrito es adecuado para la aplicación en seres humanos, mamíferos no humanos, peces y aves.

Artículos de fabricación

[0168] El método descrito puede abarcar el uso de un artículo de fabricación que incorpora la composición que comprende mirceno polimérico descrito en este documento.

[0169] La composición farmacéutica puede estar en la forma de un recubrimiento sobre el artículo de fabricación, o puede estar contenida dentro de un recipiente que es integral con el artículo de fabricación. La composición farmacéutica es ventajosamente presente como un revestimiento sobre dispositivos que se insertan en el cuerpo y están destinados para la integración en el mismo, por ejemplo un implante. La composición farmacéutica puede pues promover el cierre de tejido sobre el implante debido a la actividad de mirceno polimérico en la inducción de la diferenciación celular.

[0170] La composición farmacéutica puede incorporarse ventajosamente sobre o en artículos utilizados en la curación de la herida o tejido de reparación, por ejemplo, un apósito o vendaje. La composición farmacéutica puede promover la cicatrización de heridas debido a la actividad de mirceno polimérico en la inducción de la diferenciación celular.

[0171] En otros casos, la composición farmacéutica se puede incorporar a un dispositivo de administración tal como una aguja, un dispositivo de inyección o un dispensador de aerosol del cual la composición se entrega a un sitio del cuerpo que requiere tratamiento, por ejemplo un sitio de la herida.

[0172] Los artículos de fabricación incluyen, pero no se limitan a un artículo de tela, un pañal, un apósito para heridas, un dispositivo médico, una aguja, una microaguja, un dispositivo de inyección y un dispensador de

pulverización. El artículo de fabricación puede comprender una pluralidad de microagujas. Los dispositivos médicos e implantes son como se describen.

5 **[0173]** Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente ciertas realizaciones de la invención. No deben de ninguna manera, sin embargo, considerarse como limitantes del amplio alcance de la invención. Un experto en la técnica puede idear fácilmente muchas variaciones y modificaciones de los principios descritos en este documento sin apartarse del alcance de la invención.

10 EJEMPLOS

Ejemplo 1 Preparación de fracciones aisladas de goma de masilla de fuentes vegetales

[0174]

15 Método 1. Resina de masilla (10 g) se combinó con etanol absoluto (200 ml) y la mezcla se dejó reposar durante la noche. La mezcla se agitó, las partículas insolubles de mayor tamaño se dejaron sedimentar durante 20 minutos, y el etanol se transfirió a un nuevo matraz. El resto se agitó con una nueva porción de etanol absoluto (150 ml) durante 10 minutos. Esta fracción de etanol se combinó con la primera fracción. El procedimiento se repitió con otra porción 150 ml de etanol absoluto que se combinó con dos primeras fracciones de etanol. 20 Posteriormente, se eliminó el etanol *a vacío* usando un evaporador rotatorio (temperatura del baño de agua 30°C). Se añadió hexano (300 ml) al residuo restante y la mezcla se agitó varias veces durante un período de dos horas. Después de reposarse durante la noche en el matraz cerrado con el fin de completar la disolución de material soluble y la precipitación de cualquier material insoluble, la solución de hexano claro se transfirió a un matraz previamente pesado limpio y el hexano se eliminó utilizando un evaporador rotatorio. A la fracción aislada 25 obtenida se añadió inmediatamente la cantidad deseada de aceite y la mezcla se agitó hasta que se obtuvo una mezcla homogénea.

30 Método 2. Resina de masilla (10 g) se combinó con metanol absoluto (300 ml) y la mezcla se dejó reposar durante la noche. La mezcla se agitó, las partículas insolubles de mayor tamaño se dejaron sedimentar durante 20 minutos, y la fracción soluble de metanol se transfirió a un nuevo matraz. El material insoluble restante se agitó con una nueva porción de metanol absoluto (200 ml) durante 10 minutos. Esta segunda fracción soluble de metanol se combinó con la fracción soluble de primer metanol. El procedimiento se repitió con otra porción de 200 ml de metanol absoluto, y una fracción soluble de tercer metanol se combinó con primeras fracciones 35 solubles dos metanol. A continuación, el metanol se eliminó *a vacío* usando un evaporador rotatorio (temperatura del baño de agua 30°C). Se añadió hexano (300 ml) al residuo restante y la mezcla se agitó varias veces durante un período de dos horas. Después de reposarse durante la noche en el matraz cerrado con el fin de completar la disolución de material soluble y la precipitación de cualquier material insoluble, la solución de hexano claro se transfirió a un matraz previamente pesado limpio y el hexano se eliminó utilizando un evaporador rotatorio. A la fracción aislada obtenida se añadió inmediatamente a la cantidad deseada de aceite y la mezcla se agitó en el 40 matraz cerrado hasta que se obtuvo una mezcla homogénea.

45 Método 3. Resina de masilla (5 g) se pulverizó con mortero y se combinó con hexano (200 ml). La mezcla se agitó cada 30 minutos durante un período de ocho horas y posteriormente se dejó reposar durante la noche. La fracción soluble de hexano se eliminó del material insoluble y se transfirió a un matraz limpio. El hexano se eliminó de la fracción soluble en hexano usando un evaporador rotatorio. Después, el residuo remanente se sometió a un sistema de alto vacío (<0,01 mbar) durante al menos 24 horas con el fin de eliminar los materiales volátiles adicionales. etanol absoluto (100 ml) se añadió al residuo restante y la mezcla se agitó varias veces 50 durante un período de 1 hora. La fracción soluble en etanol se transfirió a un matraz limpio y la extracción se repitió con dos porciones adicionales de 100 ml de etanol absoluto. Las fracciones solubles en etanol se combinaron y se permitió que cualquier material insoluble restante se reposara durante la noche. La solución de etanol claro se transfirió a un matraz limpio, previamente pesado y el etanol se eliminó a vacío. Para el resto se añadió inmediatamente la cantidad deseada de aceite y la mezcla se agitó hasta que se obtuvo una formulación homogénea.

55 Método 4. Hojas, ramas suaves, frutas y bayas de árboles *Pistacia lentiscus* L., *P. atlantica* o *P. Palestina* se recogieron, se limpiaron y se pulverizaron. La disolución con etanol o metanol se llevó a cabo inicialmente esencialmente como se describe en los métodos 1 y 2, y disoluciones posteriores se llevaron a cabo usando combinaciones de etanol o metanol con un aceite vegetal para un número de ciclos.

60 Método 5. Hojas (30 g) de *Pistacia lentiscus* L. se recogieron, se limpiaron y se cortaron en trozos pequeños con un cuchillo y se colocaron en un procesador de alimentos. Se añadió el aceite de oliva (100 ml) y se procesó. Toda la mezcla se retiró y se colocó en un vaso de precipitados de vidrio. Se añadieron doscientos ml de etanol (96%) y la mezcla se calentó a 65°C durante 20 min. Toda la mezcla se coloca en una gasa y el líquido se presiona hacia fuera. La fase de etanol superior se separó por pipeteo y se desechó. Etanol residual puede 65 eliminarse de la fase de aceite por evaporación.

Método 6. Bayas (25 gramos) de *Laurus nobilis* (recogidas en mayo o junio) se lavaron con etanol (96%, 200 ml) durante 30 segundos. El etanol y las bayas se retiraron y se añadió aceite de oliva al residuo restante. Se permitió cualquier material insoluble a precipitar, y se aisló la solución de aceite claro.

5 **Método 7.** Para cada preparación, aproximadamente diez gramos de exudado de resina se recogieron de árboles *Pistacia lentiscus* L., *P. atlantica* o *Palestina P.*, en el área de Zikhron Yaakov Israel se utilizó. La resina se combinó con 30 ml de metanol en un recipiente de vidrio adecuado y la mezcla se agitó vigorosamente varias veces durante un período de tiempo de 30 minutos a 2 horas-. Una porción de la resina se disolvió, mientras que el material insoluble se instaló en la parte inferior del recipiente. El líquido superior se decantó, y se añadieron alícuotas adicionales de metanol como anteriormente, y el proceso de agitación y decantación se repitió. El material insoluble restante se sumergió después en agua destilada durante 30 segundos a 1 minuto, resultando en un líquido de color blanco lechoso con material insoluble restante. Después de varios ciclos alternos rápidos de tratamiento con agua, y metanol, el material insoluble restante se secó al aire y se pesa. Típicamente, alrededor de 1-3 gramos de material insoluble se obtuvieron a partir de diez gramos de resina de partida. Se obtuvieron resultados similares usando etanol como disolvente en lugar de metanol. La disolución de la fracción final de material insoluble se llevó a cabo inmediatamente después del secado mediante la adición de un aceite vegetal, aceite de semilla de uva o aceite de oliva típicamente, en una cantidad suficiente para proporcionar una solución de concentración deseada, típicamente 1% o 10%.

20 **Método 8.** Para cada preparación, aproximadamente diez gramos de exudado o bien (i) exudado de resina recogido de la corteza de árboles *Pistacia lentiscus* L. o *P. Palestina* que crecen en la región del monte Carmelo, Israel, o (ii) obtenido comercialmente masilla de Quíos (disponible por ejemplo, de la Asociación de Productores de Masilla de Goma Quíos o de G. Baldwin & Co.) se utilizó. La resina se pulverizó en un mortero, se transfirió a un vaso de precipitados de vidrio y se añadieron 100 ml de etanol (98%). Después de agitarse durante unos minutos, el etanol se decantó, dejando una masa reducida de la resina debido a la eliminación de material solubilizado. Se añadió una cantidad adicional de etanol, y las etapas de agitación, decantación y adición de disolvente se repitieron rápidamente para un número de ciclos, durando cada ciclo entre 5 y 30 minutos. El material insoluble que queda después del ciclo final (típicamente correspondiente a 20 a 35% en peso del material de partida comercial, o 10 a 25% del material de partida de resina recogida) se solubilizó en una de aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de semilla de uva, aceite de sésamo, aceite de algodón o aceite de soja para dar una concentración final de 8-10% (en peso).

35 **Método 9.** Masilla pulverizada (~10 g) se combinó con 100 ml de metanol. Después de agitarse durante unos minutos, el metanol se separó por decantación, dejando una masa reducida de material blanco no soluble debido a la eliminación de material solubilizado. Se añadió una cantidad adicional de metanol, y los pasos de agitación, decantación y adición de disolvente se repitieron rápidamente para un número de ciclos. El material insoluble que queda después del ciclo final (típicamente correspondiente a 20 a 30% en peso del material de partida) se solubilizó en aceite de oliva. El proceso de disolución implica típicamente el aceite de oliva se calentó a 45°C y agitación suave en el vaso de precipitados.

40 **Método 10.** Masilla pulverizada (~10 g) se combinó con 25 ml de aceite de soja y 100 ml de metanol en un vaso de precipitados de vidrio. La agitación usando un agitador magnético se llevó a cabo durante 2 horas. El disolvente se separó por decantación y metanol nuevo se añadió, seguido por agitación durante una hora. El disolvente se separó por decantación, seguido de evaporación a vacío para eliminar el disolvente residual.

45 **Método 11.** Masilla pulverizada (~10 g) se combinó con 100 ml de etanol (96%) en un vaso de precipitados de vidrio. La agitación usando un agitador magnético se llevó a cabo durante 10 minutos. El disolvente se separó por decantación y se añadió una cantidad adicional de etanol, seguido de agitación durante 5 minutos y decantación del disolvente. Los pasos de adición de disolvente, agitando y decantando, se repitieron durante 4 ciclos. Después, se añadió n-hexano (100 ml) al material blanco insoluble, seguido por agitación repetida hasta disolverse el material. Una pequeña muestra se deseca y se pesa con el fin de determinar la concentración. La mayor parte de la solución de hexano se aplicó a una columna de exclusión de tamaño calibrado y se desechó la fracción que tenía un peso molecular de hasta 1.500. La fracción que tiene un peso molecular de más de 1500 se mezcló con 20 gramos de pomada de parafina pesada. La mezcla se homogeneiza mediante mezclado repetido, y se eliminó el hexano por evaporación a vacío.

[0175] Este procedimiento también se puede realizar por parafinas y ceras que tienen aumento de peso molecular con el fin de obtener un producto más sólido de mezcla.

60 **[0176]** El término "RPh-1" se utiliza aquí para referirse a una fracción aislada preparada como en cualquiera de los métodos anteriores, y después de la disolución en un aceite adecuado, cera o combinación de los mismos.

65 **[0177]** RPh-1 se usó directamente para experimentos de cultivo celular *in vitro* o para el tratamiento de animales de prueba, típicamente a concentraciones finales que van de 0,025 a 5% en un aceite o mezcla de aceites en particular, tal como se especifica en este documento. Además, como se muestra en el Ejemplo 2, el componente principal de RPh-1 se determinó que era de 1,4-poli- β -mirceno de peso molecular en el intervalo de 5.000 a 20.000.

Ejemplo 2. Caracterización química de mirceno polimérico aislado de fuentes vegetales. Visión de conjunto

5 **[0178]** Resina de masilla de *Pistacia lentiscus* L. se extrajo de acuerdo con el método 1 o 2 para obtener la fracción deseada (denominada RPh-1), que se analizó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con el fin de definir la distribución de peso molecular. La estructura química de RPh-1 se analizó mediante resonancia magnética nuclear (RMN) seguida de fraccionamiento preparativo SEC.

10 **[0179]** Se constató que el RPh-1 contiene una fracción "ligera", con pesos moleculares inferiores a 1000 y una fracción "pesada" de polímero con un peso molecular en el intervalo de 5000 a 20.000. En base al análisis de RMN (¹H-RMN y ¹³C-RMN) el compuesto predominante en la fracción "pesada" tiene una estructura consistente con 1,4-poli-β-mirceno.

15 **[0180]** Separaciones preparativas se llevaron a cabo usando acetato de etilo y tetrahidrofurano (THF) como eluyentes. En ambos casos, la fracción de polímero "pesado" se observó para exhibir diversas actividades biológicas beneficiosas, incluyendo la de la inducción de la diferenciación celular, como se describe en los Ejemplos 4 y 6. En contraste, la fracción de "luz" demostró experimentos de eficacia de toxicidad in vitro en el uso de células epiteliales retinales pigmentadas. Se encontró que con el fin de preservar la actividad de la fracción de polímero, es muy importante protegerlo de la oxidación o reacciones de reticulación diluyéndola en un disolvente hidrófobo, preferiblemente aceite, opcionalmente en combinación con una cera.

20

Métodos

25 **[0181]** La resina de masilla (10 g) se combinó con etanol absoluto (200 ml) y la mezcla se dejó reposar durante la noche. La mezcla se agitó, las partículas insolubles de mayor tamaño se dejaron sedimentar durante 20 minutos, y el etanol se transfirió a un nuevo matraz. El resto se agitó con una nueva porción de etanol absoluto (150 ml) durante 10 minutos. Esta fracción de etanol se combinó con la primera fracción. El procedimiento se repitió con otra porción de 150 ml de etanol absoluto que se combinó con la primera fracción dos etanol. A continuación, el etanol se eliminó a vacío en un evaporador rotativo (temperatura del baño de agua 30°C. Para el resto se agregó hexano (300 ml) y la mezcla se agitó varias veces durante un período de dos horas. Después de reposarse durante la noche en el matraz cerrado con el fin de completar la precipitación de cualquier material insoluble, la solución de hexano claro se transfirió a un matraz limpio y se utilizó para separaciones analíticas y preparativas.

30

35 **[0182]** Las macromoléculas se separan mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) sobre la base de su exclusión de la fase estacionaria. En la SEC los compuestos de peso molecular más altos están totalmente excluidos de los poros del relleno y por lo tanto se eluyen primero. Los pesos moleculares de los compuestos de ensayo de polímero pueden estimarse por SEC sobre la base de comparación con una curva estándar construida con compuestos de peso molecular conocidos, por ejemplo los estándares de poliestireno. Sin embargo, los pesos moleculares de polímeros determinados sobre la base de estas comparaciones pueden estar sujetos a un margen de error inherente de al menos aproximadamente 10 a 15%, ya que la relación entre el volumen hidrodinámico y el peso molecular no es el mismo para todos los polímeros, por lo que sólo una determinación aproximada se puede hacer.

40

45 **[0183]** Por SEC analítica, una columna PLgel (7,5*300mm 5μ 10³ A°) se utilizó y se calibró con patrones de poliestireno de los pesos moleculares 1000, 2000, 5000, 10000, 30000 y 70000. Los disolventes utilizados (hexano, acetato de etilo, tetrahidrofurano (THF), diclorometano (DCM) y acetona) eran de grado analítico para la cromatografía líquida. Con fines analíticos se encontró que THF era óptima. El instrumento utilizado era una cromatografía ThermoPhinnigan TSP equipado ya sea con un detector de matriz de diodos o un detector ELSD, usando una velocidad de flujo de 1 ml/min, tiempo de 15 min y 100% de THF para la fase móvil.

50

[0184] SEC preparativa se llevó a cabo usando las siguientes condiciones:

1. Condiciones de THF:

55 Columna: PLgel: 25*300 mm 5μ 10³ A°
Fase móvil: hexano 60% /THF al 40% velocidad de flujo 11 ml/min.
La separación se repitió 12 veces con extracto de 1 ml cada uno y dos fracciones se recogieron: 1) contenido pesado MW; 2) Bajo contenido MW.

2. Las condiciones de DCM:

60 Columna: PLgel: 25*300 mm 5μ 10³ A°.
Fase móvil: hexano 70%/DCM 30% de velocidad de flujo de 11 ml/min.
La separación se repitió 12 veces con 1 ml de extracto de cada uno y dos fracciones se recogieron: 1) Contenido pesado MW; 2) Bajo contenido MW.
65 Para cada ejecución SEC preparativa, la columna se calibró con patrones de poliestireno de pesos moleculares

1000, 2000, 5000, 10000, 30000 y 70000.

[0185] Las fracciones recogidas a partir de estas dos fases móviles diferentes se dividieron en dos, una media se evaporó hasta sequedad utilizando un evaporador y se añadió 3 ml de aceite. Se añadió a la segunda mitad 3 ml de aceite y después se evaporó el disolvente orgánico. Las muestras obtenidas se analizaron para la actividad biológica.

El material pesado MW de la elución THF se analizó por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN a 300 MHz y 75 MHz respectivamente.

Resultados

SEC analítica

[0186] La Figura 1 muestra el cromatograma analítico SEC obtenido usando un detector PDA (línea debil) y un detector de ELSD-SEDEX (línea gruesa). Una fracción correspondiente al peso molecular en el intervalo de aproximadamente 60.000 a aproximadamente 5.000 (eluyendo a los 5-7 minutos) sólo se detectó con el detector ELSD. Ambos detectores indicaron la presencia de una fracción de peso molecular en el intervalo de <1,000.

SEC preparativa

[0187] La Figura 2 muestra las fracciones de peso molecular pesado (Fig. 2B) y bajo (Fig. 2A) obtenidas por SEC preparativa. La fracción pesada se obtuvo mediante SEC en DCM/hexano, mientras que la fracción ligera se obtuvo mediante la ejecución de la SEC en THF/hexano. La Tabla 1 resume las fracciones obtenidas usando SEC preparativa y varios sistemas de disolventes.

Tabla 1. Fracciones recogidas de columnas preparativas usando varios eluyentes y modos de evaporación

| Nº de fracción | intervalo de pesos moleculares | Eluyentes/modo de evaporación |
|----------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 19-1 | Pesado | THF/evaporación de hexano con aceite |
| 19-2 | Ligero | |
| 19-3 | Pesado | THF/evaporación de hexano sin aceite |
| 19-4 | Ligero | |
| 19-5 | Pesado | DCM/evaporación de hexano con aceite |
| 19-6 | Ligero | |
| 19-7 | Pesado | DCM/hexano evaporación sin aceite |
| 19-8 | Ligero | |

Análisis de RMN

[0188] La Figura 3 muestra el espectro ^1H -RMN obtenido para el material pesado MW de la preparativa SEC ejecutada en hexano 60%/THF 40%. La figura 4 muestra el espectro de ^{13}C -RMN obtenido para el material pesado MW de SEC preparativa ejecutada en hexano 50%/THF 50%.

[0189] Los análisis ^1H -RMN y ^{13}C -RMN indican que β -mirceno 1,4-polimérico es el componente principal de la fracción pesada MW obtenida a partir de SEC preparativa del disolvente polar insoluble en el material (RPh-1) a partir de masilla.

Ejemplo 3. Síntesis química de β -mirceno 1,4-polimérico

[0190] Preparaciones sintéticas de β -mirceno 1,4-polimérico se prepararon de diversos pesos moleculares, utilizando métodos que se basan en general sobre la base de los procedimientos descritos en Newmark et al (1988) J. Polym Sci.26: 71-77.

Métodos

[0191] Los siguientes reactivos se añadieron a un matraz de 3 bocas de 250 ml equipado con un condensador: β -mirceno, hexano y litio de sec-butilo en ciclohexano, todo bajo atmósfera de nitrógeno, en las cantidades que se muestran en la Tabla 2. El volumen de hexano usado en cada reacción era generalmente al menos aproximadamente 20 a 25 veces el volumen del iniciador de litio de butilo. Cada mezcla de reacción se calentó a 80°C y se agitó durante aproximadamente 1 hora. Con el fin de estimar la concentración de polímero se tomó una pequeña alícuota (unos pocos ml) de la solución y se evaporó a sequedad.

[0192] Para algunas mezclas de reacción, el litio se eliminó después de la reacción por dilución de la mezcla final con un exceso de hexano y se lavó dos veces con agua. La fase orgánica se separó y se secó con sulfato de sodio.

[0193] Para su uso en ensayos de actividad biológica y caracterización de peso molecular, una solución de 10% del polímero sintetizado en el aceite de oliva se preparó mediante la adición de aceite de oliva a una concentración final de 10% (sin hexano) y se evaporó el disolvente hexano. El peso molecular aparente se determinó usando SEC y el cálculo de una curva de calibración se preparó utilizando estándares de poliestireno de peso molecular 2000, 5000, 10000, 30000 y 70000. Las condiciones utilizadas para SEC eran las siguientes:

Columna: PLgel: 7.5*300 mm 5 μ 10³ A°
 Fase móvil: 100% de THF
 Velocidad de flujo 1 ml/min
 Detector: ELSD

Resultados

[0194] Los pesos moleculares esperados y calculados del β -mirceno polimérico producido bajo diferentes condiciones de reacción se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cantidades reactivas y peso molecular de producto de mirceno polimérico químicamente sintetizado.

| MW calculado | MW esperado | β -mirceno (mol) | litio de sec-butilo (mol) | litio de sec-butilo (ml) | Reacción n |
|--------------|-------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|------------|
| 3816,05 | 2381 | 0,0735 | 0,00420 | 3 | 1 |
| 7007,32 | 3571 | 0,0735 | 0,00280 | 2 | 2 |
| 11400,54 | 7143 | 0,0735 | 0,00140 | 1 | 3 |
| 27153,13 | 14286 | 0,0735 | 0,00070 | 0,5 | 4 |
| 46034,97 | 28571 | 0,0735 | 0,00035 | 0,25 | 5 |
| 2845,24 | 1786 | 0,0735 | 0,00560 | 4 | 6 |

[0195] Como se puede ver en la Tabla 2, las diversas condiciones de reacción produjeron mirceno polimérico que tiene pesos moleculares calculados en el intervalo de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 46.000. Los productos pueden ser designados como en el rango de mirceno polimérico de peso molecular "alto" es decir, <20.000 a aproximadamente 50.000, y mirceno polimérico de peso molecular "bajo", es decir, <3000 a ~11.000. Perfiles SEC analíticos representativos para β -mirceno polimérico de peso molecular "alto" y "bajo" se muestran en las Figuras 5A y 5B, respectivamente.

[0196] Productos de reacción lavados con agua dieron resultados sustancialmente idénticos en SEC analítica.

[0197] La Figura 6 muestra un espectro representante ¹H-RMN del producto de polimerización β -mirceno. La Figura 7 muestra un espectro representativo ¹³C-RMN del β -mirceno, producto de polimerización.

[0198] Análisis ¹H-RMN y ¹³C-RMN indican que el producto de la reacción de polimerización tiene una estructura consistente con la de 1,4-poli- β -mirceno.

[0199] La reacción sintética usada para producir β -mirceno polimérico implica un mecanismo de polimerización aniónica (conocida como la "reacción de Michael").

[0200] Para que la iniciación tenga éxito, la energía libre de la etapa de iniciación debe ser favorable. Por lo tanto, es necesario que coincida el monómero con la fuerza apropiada de iniciador de modo que la primera adición es "cuesta abajo". Una reacción típica aniónica es la polimerización de estireno usando butilo-litio, C₄H₉Li, en un disolvente inerte tal como n-hexano. Cuando se lleva a cabo en las condiciones adecuadas, las reacciones de terminación no se producen en la polimerización aniónica. Se añade normalmente un compuesto tal como agua, alcohol, oxígeno molecular o dióxido de carbono para terminar la propagación, debido a la reacción rápida con los carbaniones en los extremos de cadena.

[0201] La polimerización aniónica da lugar a distribuciones de peso molecular muy definidas porque los procesos de transferencia están ausentes. Si el disolvente es extremadamente puro, las cadenas de polímero seguirán siendo activas después de consumirse todo el monómero.

[0202] El grado de polimerización se expresa como:

$$\bar{n} = \frac{[M]}{[I]}$$

en la que M=monómero e I=iniciador.

[0203] Como se indicó anteriormente, litio de butilo es un iniciador adecuado para la polimerización aniónica para moléculas que contienen isopreno, tales como los terpenos. Por lo tanto, se ha utilizado en la síntesis de 1,4-polimircenos para la presente invención.

[0204] Mientras que el procedimiento descrito anteriormente se da a conocer en general en la técnica anterior (véase por ejemplo Newmark et al (1988) J. Polym Sci.26: 71-77), importantes modificaciones descritas en este documento son el trabajo en una alta dilución de hexano y el paso final de cambiar el disolvente al aceite, a fin de obtener polímero que conserva su actividad biológica con alta potencia.

Ejemplo 4. RPh-1 induce la diferenciación de tipo neuronal en cultivos de células del epitelio pigmentario de la retina.

Visión de conjunto

[0205] La presente invención se dirige a la inducción de la diferenciación y maduración de las células, y tiene aplicación directa a la regeneración del tejido funcional, en particular, el tejido neuronal. Nuestros resultados experimentales muestran que RPh-1 induce la diferenciación de las células epiteliales del pigmento retinal, un tejido epitelial de origen neuronal, a células neuronales morfológicas que producen axones, dendritas y uniones entre las células conocidas como sinapsis. La diferenciación morfológica de las células tratadas con RPh-1 se acompaña por la expresión de novo del antígeno de diferenciación neuronal específica $\beta 3$ tubulina. La inducción de la diferenciación de células neuronales sugiere fuertemente que RPh-1 afecta a la diferenciación de células madre neuronales en neuronas funcionales. Dogma actual sobre la patología de la demencia y la enfermedad de Alzheimer sostiene que la deficiencia implican el fracaso de las neuronas para formar uniones sinápticas funcionales (véase, por ejemplo, Kimura R, Ohno M. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. Neurobiol Dis. 2008 Nov 5).

[0206] Por consiguiente, los experimentos descritos en el presente documento apoyan el uso de una fracción aislada de masilla como se describe en el Ejemplo 1, así como de mirceno polimérico, una molécula activa en RPh-1, como una modalidad terapéutica para provocar la neuroregeneración en enfermedades neurodegenerativas tales como la demencia y la enfermedad de Alzheimer.

[0207] También se describe mirceno polimérico sintético y es útil en los métodos terapéuticos descritos.

Células del epitelio pigmentario de la retina (EPR)

[0208] Estudios dirigidos a la evaluación de los efectos de RPh-1 en diversas líneas celulares de origen humano condujeron al uso de células ARPE-19, una línea celular epitelial de pigmento de retina humana no maligna.

[0209] El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una sola capa de células epiteliales pigmentadas hexagonales de origen neuronal, que forma la capa de células más externa de la retina del ojo y está unida a la coroides subyacente. Funciones EPR incluyen apoyo, nutrición y protección de los fotorreceptores subyacentes de la neuro-retina.

[0210] Las células de EPR están involucradas en la fagocitosis del segmento exterior de las células fotorreceptoras, en el ciclo de vitamina A en el que se isomerizan retinol todo-trans a 11-cis retinal y en el suministro de los fotorreceptores con D-glucosa, aminoácidos y ácido ascórbico .

[0211] A pesar de que el EPR se pigmenta *in vivo*, células ARPE-19 no forman melanina y no se pigmentan. En cultivo, las células crecen como células en forma de husillo y poligonales.

Métodos

[0212] Células ARPE-19 (obtenidas de la American Type Culture Collection, ATCC) se sembraron en microplacas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano (Costar) a una concentración de células $2 - 5 \times 10^3$ por pocillo ($1 - 2,5 \times 10^4$ células/ml) en un medio de crecimiento que consiste en DMEM: Ham F-12, 1: 1, suplementado con 10% de suero bovino fetal, glutamina 200 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Se dejó que las células se adhieran a las superficies de la placa durante la noche antes del tratamiento con RPh-1.

[0213] RPh-1 se preparó esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, Método 1 para proporcionar una solución 10% en un vehículo compuesto de aceite de semilla de uva, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, Mygliol® 810 o Mygliol® 812. Las preparaciones se añadieron a los cultivos en volúmenes de 0,5 μ l, 2 μ l, 5 μ l y 20 μ l. Estos volúmenes, introducidos en un volumen medio de muestra global de 200 μ l, corresponden a concentraciones finales RPH-1 de 0,025%, 0,1%, 0,25% y 1%, respectivamente. El portador del petróleo sirvió como un control del vehículo y se aplicó a los cultivos de control en los mismos volúmenes.

[0214] Los cultivos se incubaron en un 37°C, 5% de CO₂ incubadora durante 72 horas. A continuación se retiró el

medio, los cultivos se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS), fijado con metanol absoluto durante 10 min y se tiñeron con reactivos Hemacolor® (Boehringer Mannheim), que tiñen las células de una manera similar a Giemsa, y puede utilizarse en un ensayo de viabilidad celular cuantitativa (véase Keisari, Y. A colorimetric microtiter assay for the quantitation of cytokine activity on adherent cells in tissue culture. J. Immunol. Methods 146, 155-161, 1992). El colorante se eluyó con 20% de SDS, y se cuantificó en un lector ELISA a 630 nm (muestras por triplicado evaluadas). Para la determinación de la expresión de tubulina beta-3, las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio estériles inmersos en 6 microplacas a una concentración de 10^5 células/pocillo en un medio consistente en mezcla 1: 1 de medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) y F12 de Ham medio, suplementado con 10 suero bovino fetal y penicilina

[0215] (100 unidades/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y glutamina (2 mM). Las células se dejaron adherir durante la noche a los cubreobjetos y 7% RPh-1 en aceite de oliva (o aceite de oliva solo para preparaciones de control) se administró a los cultivos a un volumen de 25 µl/ml de medio y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ durante 72 horas. Después, las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con 4% para-formaldehído. Para determinar la expresión de proteína de tubulina beta-3 en las células, los cubreobjetos de vidrio se tiñeron con un anticuerpo primario monoclonal de ratón dirigido contra la tubulina beta-3 humana seguida de un IgG anti-ratón marcado por FITC secundario. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Preparaciones de ensayo y de control se evaluaron a continuación en un microscopio confocal.

Resultados

[0216] Se encontró que el tratamiento de células ARPE-19 EPR con RPh-1 inducía de forma inesperada cambios morfológicos drásticos que son inequívocamente característicos de neuro-diferenciación. Los cambios morfológicos no se producen en los cultivos de control tratados con vehículo de aceite solo, y resultados similares se observaron entre los cultivos de ensayo tratados con RPh-1, independientemente del aceite usado como portador para el compuesto activo. Los cambios morfológicos también se asociaron con el cese de la proliferación celular, apoyando adicionalmente la conclusión de que RPh-1 induce la neuro-diferenciación.

[0217] Cultivos de control tratados con aceite mostraron el patrón de crecimiento típico en forma de huso y poligonal característico de las células ARPE-19 EPR (Fig. 8A). Después de 48 horas de incubación en cultivo, las células tratadas con RPh-1 (0,1%; 1 mg/ml) se alteraron en forma, y desarrollaron protuberancias individuales gruesas, de tinción densa muy largas evocadoras de axones de células neuronales (Fig. 8B). Después de 48 horas de incubación, las células tratadas con RPh-1 (0,25%; 2,5 mg/ml) muestra un número mayor de salientes largos más delgados evocadores de las dendritas (Fig. 8C) después de 72 horas de incubación con RPh-1 las protuberancias largas delgadas formaron uniones con salientes similares en las células adyacentes, creando una red de células interconectadas, potencialmente capaces de comunicar información entre una y otra (Fig. 8D). Redes similares ocurren normalmente entre las neuronas en el sistema nervioso central y permiten la transmisión y el procesamiento de la información.

[0218] Mientras que las células de control se proliferaron durante el período de incubación de 72 horas, células tratadas con RPh-1 rápidamente dejaron de proliferarse y las células se mantuvieron en la densidad escasa, apoyando adicionalmente la idea de la diferenciación celular.

[0219] El uso de las preparaciones inactivas de RPh-1 que no indujeron la diferenciación como se describió anteriormente, las células ARPE-19 comenzaron a producir grandes cantidades de gránulos de melanina y estos cultivos continuaron proliferando y la densidad celular se aumentó a confluencia.

[0220] Se demostró que el tratamiento de células ARPE-19 con RPh-1 (5% en aceite de semilla de algodón) resultó en la expresión de los marcadores neuronales y sinaptogénesis β3 tubulina (TUBB3), un marcador de diferenciación de tipo neuronal; Arco/Arg3.1, asociado con plasticidad sináptica; y pentraxina neuronal II (NPTX2), un gen temprano inmediato neuronal que funciona en la sinaptogénesis excitatoria. El análisis de inmunofluorescencia de células ARPE-19 diferenciadas mostró que después de 72 horas de incubación con RPh-1, las células se tiñeron positivamente para β3TUB, Arc/Arg3.1 y NPTX2 (Fig. 9, paneles de la derecha), mientras que poca o ninguna expresión de iones de estos marcadores se observó antes del tratamiento (paneles de la izquierda Fig. 9.).

[0221] Se obtuvo evidencia adicional de que el tratamiento RPh-1 de las células ARPE-19 condujo a la cesación en la replicación celular. Las células se trataron con RPh-1 durante 72 horas y el contenido total de proteína (en relación con el número total de células presentes en el cultivo) se comparó con células ARPE-19 de control sin tratar. Como se muestra en la Fig. 10, los cultivos tratados con RPH-1 contenían contenido de proteína significativamente menor en comparación con los cultivos de control, confirmando que la proliferación celular se terminó sustancialmente.

Un sistema de puntuación para la potencia de RPh-1 en la inducción de la diferenciación celular

[0222] Sobre la base de los resultados anteriores, un sistema de puntuación fue desarrollado para evaluar la potencia de RPh-1 para inducir la diferenciación en cultivo celular, con células cultivadas en placas 2×10^3 por pocillo.

Los grados y sus descripciones respectivas se exponen en la Tabla 3.

Tabla 3.

| Grado | Descripción del Efecto de Diferenciación |
|-------|---|
| 0 | Sin efecto. Las células proliferan, los cultivos se hacen confluentes y las células mantienen su morfología típica en forma de husillo y poligonal. |
| 1 | Las células producen la granulación pigmentada, pero continúan proliferando |
| 2 | Menos de 10% de las células se someten a cambios morfológicos para producir protuberancias alargadas de tipo dendrita |
| 3 | Aproximadamente 10-30% de las células muestran protuberancias alargadas. La proliferación celular reducida en comparación con células control sin tratar |
| 4 | Más de 30% de las células forman protuberancias alargadas de tipo dendrita que forman uniones entre las células adyacentes, así como extensiones gruesas de tipo axón. |
| 5 | El cultivo entero se somete a la diferenciación. Las células siguen siendo escasas y todas sufren cambios morfológicos que culminan en la formación de protuberancias alargadas de tipo dendritas, estructuras de tipo axón y uniones intercelulares. |

[0223] Los ejemplos representativos de los cultivos celulares en los grados 3, 4 y 5 se presentan en las Figuras 11A, 11B y 11C, respectivamente.

Ejemplo 5. RPh-1 acorta el período de recuperación de la anestesia

[0224] Se hace cada vez más evidente que la anestesia se asocia con daño neuronal, y se requieren métodos seguros y eficaces para la neuroprotección contra tales daños.

Métodos

[0225] Ratones C57B1/6, 8 por grupo fueron inyectados con RPh-1 a través de la ruta subcutánea tres veces a lo largo de 7 días (días alternos) con 0,05 ml de una solución al 3% en el aceite de semilla de uva para una dosis de 30 mg/kg. Los ratones fueron sometidos a una dosis sub-letal (120 mg/kg) de ketamina administrada a continuación a los ratones. Un grupo de control se trató con 0,05 ml del vehículo de aceite de semilla de uva.

Resultados

[0226] Después de la anestesia, los ratones tratados con RPh-1 se recuperaron significativamente más rápidamente, como se evidencia por su movilidad completa, mientras que los controles eran todavía inmóviles. La recuperación en el grupo de control como se define por la capacidad de hacerse móviles duraron 3 minutos más en el grupo de control en comparación con el grupo tratado con RPh-1. Esta observación indica que el mirceno polimérico de ingrediente activo en RPh-1 acorta el período de recuperación de la anestesia y se puede utilizar para la neuroprotección contra los efectos secundarios adversos asociados con fármacos anestésicos.

Ejemplo 6. RPh-1 induce la diferenciación de células seguido de la muerte celular en líneas celulares de tumor.

[0227] Se investigaron los efectos de RPh-1 en dos líneas celulares de melanoma y tres líneas celulares de neuroblastoma. La línea celular de melanoma humano 5151 y la línea celular de melanoma marino B16F10 proliferan en cultivo de tejidos de una manera indiferenciada y no producen melanina. Líneas celulares de neuroblastoma humano Lan-1, Lan-5 y SY5Y proliferan en cultivo como las células en forma de huso que no presentan la morfología de diferenciación.

Métodos

[0228] Las células se colocaron en placas a 2×10^3 células microplacas de fondo plano por 96 pocillos (Costar) y se cultivaron en 200 ml de medio DMEM (medio de Dulbecco) suplementado con 10 suero bovino fetal, 200 mM L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 microgramos/ml de estreptomina (todos los reactivos de Gibco-BRL). Después de la unión durante la noche, se añadió RPh-1 (de una solución 10% en aceite de semilla de uva) a los cultivos celulares para proporcionar concentraciones finales de 0,025%, 0,1%, 0,25% y 0,5%, y se continuó la incubación durante 48 y 72 horas. El vehículo de aceite de semilla de uva se utilizó como control. Después de 72 horas, las células se fijaron con metanol y se tiñeron con reactivos Hemacolor® (Boehringer Mannheim).

Resultados

[0229] Se encontró que el tratamiento de células de melanoma con RPh-1 inducía la formación de melanina después de 24-48 horas, como se muestra en la Fig. 12B y Fig. 12C, en comparación con el control de las células tratadas en la Fig. 12A. El tratamiento RPh-1 causó más detención en la replicación, como se muestra por la

densidad celular disminuida, por ejemplo en la Fig. 12D. Tras 72 horas, muerte celular se observó en cultivos incubados con cada uno de las cuatro concentraciones RPh-1 ensayadas.

[0230] Tras el tratamiento de líneas celulares de neuroblastoma Lan-1, Lan-5 y SY5Y con RPh-1 (concentración final 0,025%), las células comenzaron a desarrollar protuberancias de tipo dendrita y la proliferación celular cesó. Las concentraciones más altas de RPh-1 causaron la muerte celular en todo el cultivo. Por lo tanto, el tratamiento con RPh-1 indujo características de diferenciación similares a neuronas morfológicas que fueron seguidas por la muerte celular.

[0231] Tras el tratamiento de líneas celulares de neuroblastoma Lan-1, Lan-5 y SY5Y con una fracción aislada de polimirceno (concentración final 0,025%), las células comenzaron a desarrollar protuberancias de tipo dendrita y la proliferación celular cesó. Las concentraciones más altas RPh-1 causaron la muerte celular en todo el cultivo. Por lo tanto, el tratamiento con RPh-1 indujo características de diferenciación similares a neuronas morfológicas que fueron seguidas por la muerte celular.

Conclusión

[0232] El mirceno polimérico, un componente activo en RPh-1, se asocia con la inducción de la diferenciación de varias líneas celulares derivadas de cánceres de melanoma y neuroblastoma maligno.

[0233] Un bloque en la diferenciación terminal es reconocida como una vía importante en la perpetuación de la proliferación celular en el cáncer. La superación de este bloque ya ha demostrado ser una modalidad de tratamiento eficaz de varias formas de cáncer (por ejemplo, los retinoides en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda) y ahora se conoce como "terapia dirigida". La terapia dirigida no mata las células cancerosas pero modifica su comportamiento, principalmente mediante la inducción de la diferenciación. En consecuencia, la agresividad de muchos tipos de cáncer se puede reducir.

[0234] Como se describe en el presente documento, mirceno polimérico, se ha encontrado un ingrediente activo de RPh-1 que supera el bloqueo en la diferenciación de células tumorales, como se indica por la formación de dendritas de células neuronales) en líneas celulares de neuroblastoma, y la inducción de la formación de melanina en líneas celulares de melanoma. En ambos casos, estos cambios se asociaron con el cese de la proliferación celular y la muerte celular.

Ejemplo 7. Mirceno polímero químicamente sintetizado induce la diferenciación celular en cultivos celulares epiteliales del pigmento retiniano.

[0235] Los experimentos se llevaron a cabo para determinar si el mirceno polimérico sintético de dos diferentes rangos de peso molecular induce la neuro-diferenciación en células ARPE-19.

Métodos

[0236] Las células ARPE-19 se sembraron en microplacas de cultivo de fondo plano de tejidos de 96 pocillos (BIOFIL) a una concentración de 5×10^3 células por pocillo (2.5×10^4 células/mL) en un medio de crecimiento que consiste en DMEM: Ham F-12, 1: 1, suplementado con 10% suero bovino fetal, glutamina 200 mM, 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Se deja que las células se adhieran a las superficies de la placa durante la noche antes del tratamiento con las fracciones de mirceno poliméricos sintetizadas químicamente.

[0237] Las fracciones aisladas de mirceno polimérico sintetizado químicamente, teniendo distintos pesos moleculares, se analizaron para determinar la actividad en el ensayo de diferenciación de células EPR. La fracción 18-1 (peso molecular en el intervalo de aproximadamente 50.000 dalton), y la fracción de 18-2 (peso molecular en el intervalo de aproximadamente 20.000 dalton), que se describe en el Ejemplo 3 se utilizaron. Fracciones 18-1 y 18-2, y RPh-1 fueron preparadas a una concentración de 10% en aceite de oliva. Cada preparación se añadió a los cultivos celulares ARPE-19 usando volúmenes de 0,5 µl, 2 µl, 5 µl y 20 µl, correspondientes a una concentración final de 0,025%, 0,1%, 0,25% y 1%, respectivamente. El aceite de oliva sirvió como control del vehículo y se aplicó a los cultivos de control en los mismos volúmenes. Los cultivos se incubaron en una incubadora CO₂ de 5% a 37°C, durante 72 horas. Después se retiró el medio, los cultivos se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijaron con metanol absoluto durante 10 min y se tiñeron con reactivos Hemacolor®.

Resultados

[0238] Se han demostrado que las dos fracciones 18-1 y 18-2 tenían la actividad en la inducción de la neurodiferenciación en células ARPE-19 (Fig. 13 y Tabla 4). Se observó una actividad óptima con la fracción de 18-1 en 0,25% (como se muestra en la Fig. 13A), mientras que 0,1% era algo eficaz y 0,025% no tuvo ningún efecto (Tabla 4). El efecto de la fracción de 18-2 se muestra en la Fig. 13B.

Tabla 4. Efectos de las fracciones 18-1 y 18-2 en la diferenciación de las células ARPE 19

| Fracción | Volumen (ul) | Resultados |
|--------------------|----------------|---|
| 18-1 | 0,5 2 5 20 | Alta densidad celular. Sin diferenciación Alta densidad. Células diferenciadas Densidad inferior. Células diferenciadas. Axones largos con uniones intercelulares Muerte celular |
| 18-2 | 0,5 2 5- 20 | Baja densidad. Pocas células completamente diferenciadas. Células diferenciadas pero axones más cortos y menos frecuentes que 18-1 Muerte celular |
| RPh-1 | 0,5 2 5- 20 | Células diferenciadas en racimos. Axones largos Células diferenciadas con menor densidad. Axones largos Muerte celular |
| Vehículo de aceite | 0,5-20 | Densidad celular muy alta, sin diferenciación |

Conclusión

[0239] Los resultados observados apoyan la conclusión de que RPh-1, una formulación de una fracción aislada de la goma de masilla, tiene una actividad para inducir la diferenciación de las células neuronales.

[0240] Los resultados observados también apoyan la conclusión de que mirceno polimérico, ya sea aislado de una fuente de la planta o sintetizado químicamente, tiene una actividad para inducir la diferenciación de las células neuronales.

Ejemplo 8. El efecto de RPh-1 en la inducción de la diferenciación de células está bloqueado por la fracción soluble en disolvente polar presente en la resina de masilla.

Visión de conjunto

[0241] Resina de masilla y diversos compuestos identificados en la misma se han asociado con una variedad de actividades biológicas y terapéuticas beneficiosas. Varias descripciones de la técnica anterior indican que la actividad biológica se asocia con una fracción que se obtiene por extracción de masilla con un disolvente polar, y la recuperación del material soluble en disolvente polar. Por el contrario, RPh-1 es una fracción que ha sido aislada a partir de resina de masilla sobre la base de que sea soluble en ambos disolventes orgánicos polares y disolventes orgánicos no polares, mientras que los compuestos que son solubles sólo en disolventes orgánicos polares pero no en no disolventes orgánicos polares se descartaron (este último designado en el presente documento como Fracción SP). Un componente importante en RPh-1 es mirceno polimérico, como se muestra en el Ejemplo 2. Sin embargo, este compuesto, previamente no se ha atribuido con efectos beneficiosos, sino que ha sido reconocido para interferir con la administración oral y la biodisponibilidad de los compuestos activos presentes en la resina de masilla. La Fracción SP corresponde a fracciones de masilla de técnica anterior a las que se han atribuido varias actividades biológicas beneficiosas. El objetivo del presente estudio era el de evaluar el efecto de la SP en el efecto de la diferenciación celular ejercida por RPh-1. Ahora se describe que los compuestos presentes en SP interfieren con los efectos de diferenciación celular inducida por RPh-1 y los bloquean.

Métodos

[0242] La resina de masilla se trató para obtener RPh-1, esencialmente como se describe en el Método 1 del Ejemplo 1, usando etanol como el disolvente polar. La fracción soluble en etanol se separó por decantación del material insoluble para obtener la fracción SP. Las mezclas de RPh-1 y fracción de SP en diferentes proporciones se prepararon de la siguiente manera:

| Mezcla | RPh-1 (%) | Fracción SP (%) |
|--------|-----------|-----------------|
| A0 | 95 | 5 |
| A1 | 90 | 10 |
| A2 | 80 | 20 |
| A3 | 70 | 30 |
| A4 | 50 | 50 |
| A5 | 25 | 75 |

[0243] Además, la masilla entera disuelta en aceite (calentada a 60°C) se preparó para obtener preparación TC.

[0244] Los resultados del estudio, resumidos en la Tabla 5, indican que las fracciones ricas en RPh-1 (A0 y A1) fueron eficaces para la inducción de la diferenciación ARPE-19. Los cambios morfológicos observados en estos cultivos eran similares a los mostrados en las figuras 8B y 8C. A medida que se aumentaba la proporción de la fracción SP en las mezclas, la muerte celular se incrementó, sin observarse diferenciación celular. Las células en los cultivos tratados con SP solo fueron muertas en todas las dosis de la prueba, y la fracción de TC ejerció sólo un efecto insignificante.

[0245] Estos resultados muestran que las actividades inductoras de neurodiferenciación potente solo se aportaron por los polímeros en RPh-1, mientras que la fracción polar SP sólo causó la muerte celular.

Tabla 5. Efectos de mezclas de RPh-1 y SP sobre la diferenciación celular

| Fracción | Volumen (ul) | Resultados |
|----------|--------------|--|
| A0 | 0,5 | Alta densidad celular, células diferenciadas. |
| | 2 | Baja densidad celular. Células diferenciadas con axones largos. |
| | 5-20 | Muerte celular. |
| A1 | 0.5 | Alta densidad celular. Menos células diferenciadas que en A0. |
| | 2 | Diferenciación. |
| | 5 | Baja densidad celular. Células diferenciadas con axones largos |
| | 20 | Muerte celular. |
| A2 | 0,5 | Baja densidad celular. Diferenciación. |
| | 2 | Células parcialmente diferenciadas (sólo dendritas cortas) asociadas a la muerte celular |
| | 20 | Muerte celular. |
| A3 | 0,5 | Diferenciación parcial esporádica. Alta densidad celular (proliferación celular). |
| | 2-20 | Muerte celular. |
| A4 | 0.5 | Muerte celular, tóxica |
| | 2-20 | Muerte celular. |
| A5 | 0,5-20 | Muerte celular. |
| RPh-1 | 2 5 | Células diferenciadas con uniones intercelulares y axones largos |
| | 20 | Diferenciación y axones largos |
| | 20 | Muerte celular. |
| SP | 0,5-20 | Muerte celular. |
| TC | 0,5 | Efectos insignificantes |
| | 2 | Muerte celular. |
| Vehículo | 0,5-20 | Alta densidad |

Ejemplo 9. Curación de heridas en perros

[0246] Un perro macho Golden Retriever envejecido tenía una herida abierta en la pierna crónica durante más de 6 meses. La lesión dérmica se asoció con alopecia (pérdida de pelo) y despigmentación de la piel circundante. El perro fue tratado por varios ciclos de tratamiento tópico con RPh-1. Después de la aplicación inicial, edema transitorio con hinchazón se produjo durante 16-20 horas. Esto fue seguido por la formación de novo de tejido funcional epitelial (epitelización) y neoangiogénesis (formación nueva de microvasculatura) con contornos de tejido normal, como resultado de las formaciones rápidas y vigorosas de tejido de granulación. La cicatrización de heridas se contrajo hacia adentro hacia el centro de la herida, lo que sugiere la presencia de fibro-miocytes (de origen mesodérmico).

[0247] La herida se curó por completo en aproximadamente 12 semanas con la piel predominantemente funcional y nuevo crecimiento del pelo. La figura 14 muestra la zona afectada antes (Fig. 14A) y después (Fig. 14B) del tratamiento con RPh-1.

[0248] En otro perro macho envejecido afectado por la alopecia, el tratamiento tópico con RPh-1 resultó en crecimiento del pelo para integrarse con el pelo circundante.

[0249] Un perro diferente tenía un tumor de mandíbula (no inducido), partes del cual sobresalía en la cavidad bucal. Las partes salientes se extirparon quirúrgicamente, mientras que las secciones del tumor que se incrustan dentro de la mordaza no podían eliminarse. El tumor fue diagnosticado como un sarcoma. Se aplicó RPh-1 formulado en el aceite de semilla de uva a la zona de la mandíbula afectada. El tratamiento llevó a cabo la curación completa de las encías que cubrían el sitio de la incisión quirúrgica en la medida en que ninguna cicatriz permanecía y el sitio de incisión quirúrgica ya no era discernible. Incluso se impidió la repetición esperada del tumor a partir de porciones

incrustadas en la mandíbula para un intervalo prolongado de varias semanas. El tratamiento con RPh-1 indujo una curación extraordinariamente rápida de la zona de la incisión quirúrgica y la regeneración completa de las encías.

5 **[0250]** En los dos casos anteriores, la cicatrización de heridas fue acompañada por un aumento general de la vitalidad, la conciencia mental y la actividad física en los perros tratados.

[0251] Los resultados anteriores apoyan el uso de mirceno polimérico, el componente activo de RPh-1, para la cicatrización de heridas, la regeneración de los folículos pilosos y la reversión de la degeneración neurológica.

10 Ejemplo 10. El tratamiento de heridas en los peces.

[0252] Peces de oro, así como peces koi (ambos parte de la familia de las carpas) son propensos a úlceras de integumento causadas por bacterias, en particular, *Aeuromonas hydrophila*.

15 **[0253]** Peces de oro con un peso aproximado de 100 gramos cada uno, que se habían desarrollado ulceraciones bacterianas fueron divididos en dos grupos en tanques separados, conteniendo cada grupo cuatro peces. Cada tanque se llena con un volumen de 100 litros de agua y se mantiene bajo aireación con una bomba de aire. Los grupos se asignaron al azar en peso y tamaño de la herida (en el intervalo de 1-1,5 cm por 1-1,5 cm). Cada pez se inyectó por vía intramuscular a través de tegumento intacto en un sitio de aproximadamente 5 mm a partir de una
20 úlcera con 20 microlitros de cualquiera de aceite de semilla de uva solo (grupo control), o una solución de 1% de RPh-1 en el aceite de semilla de uva (grupo de tratamiento).

[0254] Peces en el grupo de prueba comenzaron a mejorar progresivamente después de 4 ciclos de tratamiento con RPh-1 y se curaron durante un período de un mes. Todos los peces en este grupo sobrevivieron a través de la
25 duración de seis semanas del estudio. Estos peces también mostraron un comportamiento alerta y sensible, como la natación activa, la búsqueda y obtención de alimentos proporcionados en la superficie del agua, y movimiento rápido y sorprendido de alejamiento en respuesta a la percusión en la pared del tanque.

[0255] Por el contrario, los peces en el grupo de control no mostraron ninguna mejora en la condición de sus
30 úlceras. Los peces estaban letárgicos, mostraron un comportamiento sedentario en la parte inferior del tanque, y no respondieron a la estimulación. Todos los peces en este grupo murieron a finales de seis semanas.

[0256] Las diferencias entre estos dos grupos fueron muy significativas en ambos parámetros: la supervivencia de peces y cierre de la herida.

35 Ejemplo 11. Efecto de RPh-1 en la cicatrización de heridas usando modelo de ratones B6.V-Lepob/OlaHsd

[0257] Ratones B6.V-Lepob/OlaHsd (ob/ob) (expresan obesidad a la edad de 4 semanas) se utilizaron para evaluar el efecto de RPh-1 en la curación de heridas. La punción de piel de espesor total se realizó con un punzón de
40 biopsia desechable (Uni-Punch® Disposable Biopsy Punch, Premier) en la zona distal de cada ratón. La punción tiene forma de elipse. La longitud media de eje largo de pinchazos osciló entre 5,1 y 5,3 mm. La longitud media del eje ancho de pinchazos osciló entre 4,8 a 5,1 mm. RPh-1 (5%) en aceite de oliva se inyectó por vía subcutánea en dos sitios que rodean la herida a una distancia de 3-5 milímetros desde el borde de la herida (Grupo A, n = 6) o por vía tópica sobre la herida (Grupo B, n = 6). El vehículo se aplicó tópicamente en las heridas de ratones (Grupo C, n =
45 6). A partir de entonces, se aplicó RPh1 (5%) 3 veces a la semana, 7 veces en total, durante los 16 días del estudio en un volumen de dosis de 20 ul (inyección) o un volumen de dosis de 50 ul (administración tópica).

[0258] Fig. 15 muestra que en el día 11 después de infligir la herida, el tamaño de la herida (área de la herida) se redujo significativamente en los ratones tratados con RPh-1 (Grupo A) en comparación con los tratados con vehículo solo (p = 0,005) (Grupo C) . La tasa de curación de las heridas durante el período comprendido entre el día 0 al día
50 11 después de infligir la herida fue significativamente más rápida en ratones tratados con RPh-1 en comparación con los tratados con vehículo solo (p = 0,034).

55 Ejemplo 12. Efecto de RPh-1 en la reversión de los efectos neurodegenerativos de hipoperfusión cerebral crónica (demencia vascular) en un modelo de rata.

[0259] La demencia vascular (DV) es un subtipo de demencia, con una prevalencia que sólo es superada por el de la enfermedad de Alzheimer en las sociedades occidentales. VD causa muchos problemas neuropsiquiátricos y físicos, y representa una carga económica significativa. Las imágenes del cerebro han revelado cambios obvios en
60 la corteza cerebral y la sustancia blanca, y se cree que estas lesiones son la patología de núcleo para la disminución cognitiva en pacientes con demencia vascular (véase, por ejemplo, Farkas et al., Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain. Acta Neuropathol. 2004;108:57-64; Stenset et al., White matter lesion subtypes and cognitive deficits in patients with memory impairment. Dement Geriatr Cogn Disord. 2008 26: 424-431).

65 **[0260]** Las lesiones cerebrales pueden ser inducidas experimentalmente en los cerebros de ratas mediante la

oclusión permanente de las dos arterias carótidas que pueden afectar la función cognitiva. Este modelo es similar a la demencia vascular y la técnica experimental puede disminuir el flujo sanguíneo en la corteza cerebral y el hipocampo en hasta un 40 a 80% durante varios meses, induciendo ciertos trastornos de aprendizaje. Por lo tanto se utilizó este modelo para estudiar los efectos del tratamiento RPh-1 en la reversión de las deficiencias causadas por lesiones de demencia vascular.

[0261] Un total de 40 animales fueron asignados al azar en 3 grupos, es decir, un grupo de control sin tratamiento simulado, un grupo de control de vehículo y un grupo tratado RPh-1 (10-15 animales por grupo). Éstos se dividieron aleatoriamente en 3 grupos, un grupo control simulado sin tratar, un vehículo de control y un grupo tratado RPh-1. Diez µl de RPh-1 (5% en aceite de semilla de algodón) o vehículo administrado por vía subcutánea 2 veces/semana, con la primera dosis administrada 14 días después de la inducción de la demencia vascular.

[0262] La prueba de laberinto de agua de Morris (MWM) es sensible a la función del hipocampo. La tarea del laberinto de agua se realiza para evaluar dos déficits de aprendizaje relacionados con CCA utilizando el método descrito anteriormente (Watanabe et al, Cilostazol Stroke 2006; 37 (6): 1539-1545). En una piscina circular de diámetro de 160-cm llena de agua de profundidad 20 cm, se prepara una plataforma acrílica transparente circular, cuya superficie superior es de 3 cm por debajo del agua. Las ratas son liberadas frente a la pared, y el tiempo necesario para escapar a la plataforma se registra como la latencia de escape. Las pruebas se realizaron en el día 3 antes de la oclusión y la CCA en los días 14, 35, 56, 84 y 112 después de la oclusión CCA. En los días de entrenamiento seis ensayos de entrenamiento se llevaron a cabo por día con un intervalo entre ensayos de 2 min. Los animales se colocan en la piscina en una de las seis posiciones de partida. En cada ensayo de entrenamiento, el tiempo y la longitud del camino necesario para escapar a la plataforma oculta se registran. Los resultados de seis ensayos de entrenamiento se promedian para obtener un único valor representativo, y los promedios se utilizan para los análisis estadísticos finales. A los animales que encontraron la plataforma se les permite permanecer en la plataforma durante 30 segundos. Los animales que no se encuentran dentro de la plataforma de 90 seg se guían suavemente a la plataforma durante 30 segundos al final de la prueba.

[0263] El rendimiento de los animales tratados con RPh-1 (barras rayadas), animales tratados con vehículo (barras blancas) y en animales de control de simulacro (barras negras) en cuanto a la frecuencia en la ubicación de la plataforma (Fig. 16A.); el tiempo empleado en el área de la plataforma (Fig. 16B.); la latencia para encontrar la plataforma (Fig. 16C.); la frecuencia en la zona 1 (Fig. 16D.); el tiempo empleado en parte la luz (Fig. 16E.); la latencia para encontrar la plataforma (Fig. 16F.); y la velocidad (Fig. 16G). Todas las pruebas mostraron un rendimiento significativamente mayor en los animales tratados con RPh-1 en comparación con al menos uno de los grupos de control.

Ejemplo 13. Efecto de regulación de control de peso patológica de RPh-1 (efecto orexigénico y anti obesidad).

[0264] Los perros con diversas heridas descritas en el Ejemplo 9, además, sufrieron una pérdida de apetito y no comían alimentos que se colocaban delante de ellos. Tras aproximadamente 10 días de tratamiento con RPh-1 como se describe, los perros gradualmente recuperaron su interés en los alimentos y empezaron a comer. Dentro de un mes, los perros mostraron un fuerte interés en los alimentos y el apetito era similar al de los perros sanos normales.

[0265] Los peces con ulceraciones descritas en el ejemplo 10, además, sufrían de pérdida de apetito. El grupo de control siguió ignorando alimentos aplicados en el agua, mientras que los peces tratados con RPh-1 respondieron con entusiasmo al movimiento rápido en respuesta a la administración de los alimentos.

[0266] Las ratas descritas en el Ejemplo 12, además, sufrieron una pérdida de peso después de la hipoperfusión cerebral crónica. Después de 35 días de tratamiento (día 56 de estudio) las ratas tratadas con RPh-1 como se describen, recuperaron su peso significativamente más rápidamente que los animales tratados con vehículo (Fig. 17A).

[0267] Los ratones descritos en el Ejemplo 11 generalmente sufren de obesidad como resultado de la mutación del gen leptina. La Figura 17B muestra que la administración subcutánea de RPh-1 a ratones (grupo A; símbolos de diamante), provoca una ganancia significativa de peso corporal más bajo en comparación con los animales tratados con vehículo (Grupo C; símbolos triángulo) o los animales tratados mediante la administración tópica de RPh-1 (Grupo B; símbolos cuadrados). Los ratones del grupo A ganaron 4,9% durante los 11 días. La ganancia de peso corporal se comparó del peso corporal inicial (día 0). El aumento de peso corporal en el grupo A es significativamente más bajo que la ganancia media de peso corporal de los ratones del grupo B (valor $p = 0,02$, PRUEBA T, Excel). Los ratones del grupo C fueron similares ($p = 0,08$) a los ratones del grupo B y ganaron peso corporal de un modo significativamente diferente (valor de $p = 0,04$) que los ratones del grupo A. Los ratones del grupo B y C ganaron 10,2% y 9,1%, respectivamente. La tasa de ganancia de peso corporal en todos los grupos del modo expresado por las laderas era similar ($p = 0,07$ (A vs B), 0,08 (A vs. C) y 0,43 (B vs. C).

[0268] Las observaciones anteriores apoyan la conclusión de que RPh-1 es el regulador de trastorno de peso patológico y puede servir como un agente orexigénico (estimulante del apetito) o agente anti-obesidad.

Ejemplo 14. Efecto de RPh-1 en modelo de derrame en ratas de oclusión de arteria cerebral media transitoria (tMCAO).

5 **[0269]** En un estudio para evaluar la capacidad de RPh-1 para prevenir o revertir el déficit neurológico como resultado de isquemia utilizando el modelo de oclusión arterial cerebral media transitoria de rata (tMCAO), RPh-1 (5% en aceite de semilla de algodón) se administró por vía subcutánea a una dosis 10 μ l y la primera administración se realizó 3 horas después de la intervención quirúrgica y después dos veces por semana hasta el final del estudio en el día 28. Durante el estudio neurológico, las funciones motoras y somatosensoriales se pusieron a prueba en una batería de pruebas de comportamiento.

[0270] A lo largo del estudio no se observaron diferencias significativas en las condiciones fisiológicas generales, el aumento de peso corporal o signos clínicos generales entre los dos grupos.

15 **[0271]** Se observaron claras diferencias entre el grupo tratado RPh-1 y el vehículo tratado con el grupo de control en función de la recuperación neurológica después del accidente cerebrovascular durante los 28 días después del accidente cerebrovascular. En general, la recuperación acelerada y mejorada se demostró en animales que fueron tratados con RPh-1. Funciones somatosensoriales eran más sensibles al tratamiento, y la respuesta significativa fue demostrada ya en el día 8 después del accidente cerebrovascular (Figs. 18A y 18C). La evaluación de Neuropuntuación mostró diferencias significativas que sólo se observaron en ratas tratadas con RPh-1 (Grupo A), entre el día 8 y el día 14, y entre el día 8 y día 28 (Fig. 18A). La recuperación neurológica según la evaluación de la prueba de retirada del parche sólo era significativa en las ratas tratadas con RPh-1 (Grupo A) entre el día 2 y los otros días (Fig. 18C). La mejora de la función motora, según la evaluación de la prueba paso a paso, sólo era significativa en las ratas tratadas con RPh-1 (barras negras), en el día 28 (Fig. 18B).

25 Ejemplo 15. Efecto de RPh-1 en las células ganglionares de la retina (RGC).

[0272] Axotomía del nervio óptico se realizó en el ojo derecho de ratas profundamente anestesiadas (19 ratas por grupo). El grupo de ensayo recibió una inyección subdérmica en la zona posterior del cuello de RPh-1 (5% en aceite de semilla de algodón; 0,025 mL/inyección), y el grupo de control se inyectó de manera similar con el mismo volumen de vehículo. La primera inyección se dio a todos los animales inmediatamente después de la cirugía. Las inyecciones posteriores (misma dosis y forma de administración) se administraron dos veces a la semana, cada 3 a 4 días.

35 **[0273]** Catorce días después de axotomía, se insertó un neurotrazador retrógrado fluorescente (Di-Asp) en el nervio óptico axotomizado con el fin de manchar las células supervivientes ganglionares retinianas (RGC), y 24 horas más tarde, las ratas se sacrificaron en una cámara saturada por CO₂ y el ojo derecho lesionado se trató por enucleación. Se aislaron las retinas, se aplanaron en un portaobjetos y se fijaron con medio de montaje en base a xileno.

40 **[0274]** Las retinas de montaje completo se evaluaron con un microscopio de fluorescencia. Las células teñidas se contaron manualmente. El número medio de RGC por grupo se muestra en la Fig. 19, mostrando un número significativamente mayor de células en el grupo de prueba RPh-1.

45 Ejemplo 16. Modelo de Desprendimiento de Retina (DR).

[0275] El desprendimiento de retina (DR) se llevó a cabo en el ojo derecho de los animales profundamente anestesiados (xilacina 50 mg/kg y ketamina 35 mg/kg) después de la dilatación de la pupila con gotas de tropicamida 0,5%. DR se indujo mediante la generación de una pequeña abertura en la retina en la serata ora seguida de una inyección sub-retinal de 5 μ l de solución salina con una aguja de jeringa 30G. Aproximadamente la mitad de la zona de la retina se separó por este procedimiento.

50 **[0276]** Las ratas con DR se dividieron en dos grupos experimentales, con el grupo de prueba que recibe una inyección sub-cutánea en la zona posterior del cuello de RPh-1 (5% en aceite de semilla de algodón; 0,025 mL/inyección), y el grupo de control inyectado con el mismo volumen de vehículo. La primera inyección se dio a todos los animales inmediatamente después de la cirugía. La segunda inyección (misma dosis y forma de administración) se administró 48 horas después de la cirugía.

60 **[0277]** En los días 3 y 14 días después de la DR, las ratas operadas fueron sacrificadas en una cámara saturada CO₂. El ojo derecho lesionado y el ojo izquierdo no tratado fueron enucleados. Se aislaron las retinas, se congelaron en hielo seco y se procesaron para análisis de transferencia Western o análisis inmunohistoquímico. Las retinas de los ojos de izquierda sirvieron como controles no operados.

65 **[0278]** Se estudiaron los niveles de expresión de Semaforina3A (Sema3A), Neuropilina1 (NP1), y GAP43, Caspasa3 se utilizó como un marcador de apoptosis, y se examinaron los cambios morfológicos en Müller y células microgliales.

[0279] Sema3A es un inhibidor del crecimiento axonal que se ha demostrado estar involucrado en la pérdida de células ganglionares de la retina después de una lesión en el nervio óptico. Los niveles altos de Sema3A se detectaron en retinas después de DR como se muestra por análisis de transferencia Western (Fig. 20A). El tratamiento con RPh-1 disminuyó claramente los niveles de expresión Sema3A, tanto en las retinas de control no lesionadas y aquellos con DR (Fig. 20A). Las muestras se normalizaron a la expresión de beta-actina (banda inferior, Fig.20A)

[0280] El análisis inmunohistoquímico de secciones de retina de 20 µm incubadas con el anticuerpo anti-Sema3A y el tinte nuclear Sytox Blue mostró que la expresión Sema3A fue claramente superior en desprendimiento de retina en comparación con los controles. Se observó expresión Sema3A principalmente alrededor de las células ganglionares de la retina. Similar a los resultados observados en el análisis de transferencia Western, la expresión Sema3A se redujo en los animales DR tratados con RPh-1.

[0281] NP1 es un receptor Sema3A funcional. Células TUNEL-positivas, indicando los procesos de apoptosis, fueron evidentes 24 horas tras el desprendimiento de retina y se aumentaron después de 7 días.

[0282] La caspasa-3 se activa en respuesta a DR. Sin embargo, la elevación de caspasa-3 se atenuó significativamente en los animales DR tratados con RPh-1 (Fig. 20B).

[0283] GAP43 es una proteína intracelular que está estrechamente conectada con la membrana de los conos de crecimiento. Se expresa normalmente durante el proceso de la sinaptogénesis. En la retina, GAP43 se expresa en las neuronas en una etapa temprana de la embriogénesis, mientras que el nervio óptico todavía se está alargando. En el nervio óptico de la rata, GAP43 se encuentra tanto en los axones y cuerpos celulares de las CGR, pero la expresión desaparece a la edad de 8 a 16 semanas, y se encuentra de nuevo después de una isquemia o lesión en el nervio óptico.

[0284] Los cambios morfológicos de las células de Müller se estudiaron mediante la tinción para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). GFAP etiqueta las células de Muller en la retina, y se utiliza comúnmente como un indicador de estrés. El etiquetado de GFAP en la retina de control intacto se concentró en la GCL. El análisis inmunohistoquímico mostró niveles elevados de GFAP en los desprendimientos de retina en comparación con los controles. Las retinas desprendidas tratadas con RPh-1 mostraron niveles más altos de GFAP.

[0285] La invasión y activación microglial son consideradas como perjudiciales o beneficiosas para las neuronas. La activación microglial después de la lesión del SNC aguda es principalmente una respuesta de células glial reactiva y adaptativa, que se activa por las neuronas lesionadas y que se diseña para mejorar el daño tisular primario y para promover la reparación posterior y gliosis (cicatriz glial) como resultado. La microglia se activó en la retina por lo general después de la lesión, estimulan y reclutan células endoteliales y fibroblastos. El análisis inmunohistoquímico de las secciones de retinas desprendidas de y no lesionadas etiquetadas con IB4 y teñidas con la tinción nuclear PI mostraron evidencia de células microgliales activadas sólo en retinas desprendidas. Sin embargo, en retinas desprendidas de animales tratados con RPh-1, menos activación microglial era evidente en comparación con retinas desprendidas de los animales que fueron tratados con vehículo.

[0286] Los resultados mostraron una reducción en el reclutamiento de la microglia activa en torno a una región de lesión y apoyan un mecanismo de reparación libre de cicatrices de heridas.

Ejemplo 17. Preparación de complejos de ciclodextrina con mirceno polimérico.

[0287] Las ciclodextrinas, en virtud de su capacidad para formar complejos de inclusión con muchos medicamentos, pueden aumentar sustancialmente la solubilidad acuosa de los productos biofarmacéuticos, en particular los que se definen como insolubles en agua, tales como mirceno polimérico. Las ciclodextrinas son compuestos solubles en agua, que pueden formar complejos reversibles con moléculas poco solubles en agua dando como resultado un complejo de inclusión molecular soluble. Cuando el complejo de inclusión de la combinación de fármaco-ciclodextrina se diluye en un volumen suficientemente grande de agua o la sangre, se disocia rápidamente, liberando el agente farmacológicamente activo secuestrado.

[0288] La complejación de mirceno polimérico con β-HPCD se realiza como sigue:

- a. Disolución de mirceno polimérico pre pesado en una cantidad mínima de disolvente no polar tal como hexano, heptano, o similar.
- b. Adición gota a gota del disolvente no polar al polvo β-HPCD.
- c. El secado a 50-80°C hasta la evaporación del disolvente no polar.
- d. La mezcla con la cantidad necesaria de agua.

e. Disolución con sonicación y calentamiento.

f. Filtración a través de un filtro 0,2 a 0,45 µm.

5 Ejemplo 18. Preparación de nanoemulsiones de mirceno polimérico.

10 **[0289]** Formulaciones de nanoemulsión líquida de aceite-en-agua han de prepararse por técnicas de emulsificación a alta presión de todos los ingredientes lípidos y el mirceno polimérico de componente activo disuelto en la fase de aceite de lípidos y emulsionarse con una fase acuosa, proyectada para dar lugar a la formación de nanogotas lípidas que contienen fármaco estables, esféricas y uniformemente dispersas. La reducción del tamaño de gotas de emulsión es esencial para generar formulaciones de fármacos con alta estabilidad. Las gotas de nanoemulsión preferidas tienen un tamaño medio de gota de menos de una micra (generalmente en el intervalo de 0,1 a 0,2 µm) uniformemente dispersadas en una fase acuosa. La singularidad del núcleo de aceite hidrófobo interno grande de las gotas de nanoemulsión proporcionan una capacidad de alta solubilización para compuestos insolubles en agua tales como mircenos poliméricos.

1. Preparación de fase oleosa

20 **[0290]** La fase de aceite se compone de 13% lipóide E-75, 0,026% αTP-succinato, propilparabeno como antioxidante y 86,9% Miglyol® 810. El mirceno polimérico preparado como en el Ejemplo 1 se disolvió en la fase oleosa. Los componentes se mezclan con calentamiento suave hasta que se obtenga una solución completamente solubilizada homogénea.

2. Preparación de la fase acuosa

25 **[0291]** La fase acuosa se compone de 0,1% de EDTA, 0,5% de Tween-80, 2,3% de glicerol, metilparabeno como conservante y 97,1% de agua. pH se ajustó a 7,4 con NaOH 1N.

3. La mezcla de fases de aceite y acuosa

30 **[0292]** Fase de aceite (3,7 g) se calentó y se añadió a 70 ml de la fase acuosa (precalentada). La mezcla se agita suavemente durante 10 a 15 min a temperatura ambiente.

4. Preparación de emulsión gruesa de aceite en agua

35 **[0293]** Una emulsión de aceite en agua se prepara usando el dispensador de tamaño medio y unidad de homogeneización de alto cizallamiento Polytron®, a 20.000 rpm durante 5 min.

5. Dimensionamiento la emulsión a la gama submicrónica por homogeneizador de alta presión Gaulin®

40 **[0294]** El tamaño de gotas de la emulsión obtenida después de la etapa 4 se reduce a la gama submicrónica (nanosize) mediante la presentación de la emulsión a homogeneización a alta cizalla usando el homogeneizador de alta presión Microlab 70 Gaulin® a presión de 800 bar. Un total de 5-6 ciclos se debe realizar para obtener gotitas de nanoemulsión homogéneas que tienen un tamaño medio de partícula de menos de 200 nm. El tamaño de partícula debe ser determinado por espectroscopia de correlación de fotones (PCS) usando un analizador de tamaño de partícula N4MD (Coulter® Electronics, Reino Unido). Cuando la mayor parte de las partículas (> 90%) son más pequeñas que 200 nm, se determina que el proceso de dimensionamiento es completo.

6. Filtración estéril

50 **[0295]** La filtración en condiciones asépticas de la nanoemulsión a viales estériles usando un 0,2 µm PES filtro estéril y el almacenamiento a 40°C.

55 Ejemplo 19. Preparación de polvo de mirceno polimérico secado por pulverización.

60 **[0296]** Un procedimiento conveniente para la fabricación del producto de la mezcla polimérica mirceno-lípido es mediante secado por pulverización directa de la formulación de una mezcla de dispersión de disolvente no polar que contiene todos los ingredientes de lípidos y el agua que contiene los componentes hidrófilos, teniendo en cuenta la rentabilidad y las consideraciones de ampliación de la escala. El método de secado por pulverización seleccionado está optimizado para obtener un polvo fino, que fluye libremente. El mirceno polimérico se disuelve en la fase lipídica que contiene la lecitina de ingredientes de lípidos, tricaprina (triglicérido de ácido cáprico), succinato de tocoferol y se calentó (~ 40°C) en un disolvente no polar hasta obtener una buena dispersión. Una dispersión de dióxido de silicio de pirólisis (Cab-O-Sil®) en agua (5%) se preparó por la inflamación del polvo en agua purificada. La suspensión resultante (precalentada a 40°C) se vertió después lentamente en la dispersión de lípidos de disolventes no polares y la mezcla se agita a 40°C durante aproximadamente 1 h hasta obtener una dispersión homogénea. Después, la mezcla se seca por pulverización usando el secador por pulverización GA32 Yamato Pulvis®. Las

condiciones de secado por pulverización son: velocidad de flujo 7mL/min, temperatura de entrada 130°C, temperatura de salida 70°C, y el aire de secado de flujo 0,5 m³/min. Se espera obtener un polvo seco homogéneo que contiene la mezcla polimérica mirceno-lípido.

- 5 **[0297]** Se espera que la formulación de mezcla polimérica mirceno-lípido preparada por el proceso de secado por pulverización directa muestra una buena dispersabilidad en agua, siendo por lo tanto adecuada para la preparación de formas sólidas de dosificación tales como cápsulas de gelatina dura o comprimidos para la administración oral mejorada de polímero mirceno con potencial de buena biodisponibilidad oral.

10 Ejemplo 20. Preparación de preparaciones liposomales que contienen mirceno polimérico.

- 15 **[0298]** Los lípidos que contienen mircenos poliméricos disueltos se disolvieron en 100 mL de diclorometano en un matraz de fondo redondo, y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente hasta obtener una solución transparente clara. El disolvente se evaporó usando una unidad de evaporación rotativa a 39°C. En primer lugar, el matraz se hace girar a 4,5 rpm, 5 min a presión atmosférica, seguido de 10 a 30 min (hasta completa evaporación del disolvente) bajo vacío débil, y finalmente 15 min bajo vacío total. Al final del proceso de evaporación se creará una lámina de lípidos uniforme. La lámina de lípido se disolvió en 15 mL de tampón isotónico. Los liposomas se preparan por agitación vigorosa durante 10 a 30 min usando agitador multi-muñeca, hasta formar una dispersión uniforme y lechosa de vehículo multilamelar (MLV) y ninguna lámina de lípido restante serán evidente. Con el fin de obtener una preparación de liposomas equilibrada y homogénea, el matraz se agitará adicionalmente a 37°C durante 30 a 90 min. a 270 rpm.

20 Ejemplo 21. Preparación de microemulsiones que contienen mircenos poliméricos.

- 25 **[0299]** Varios tensioactivos comúnmente usados en la administración parenteral se pueden utilizar para desarrollar microemulsiones de agua en aceite y de aceite en agua aceptables para uso inyectable, oral y tópica. Los tensioactivos farmacéuticamente aceptables adecuados para la formación de formulaciones de microemulsiones son tensioactivos no iónicos incluyendo aceite de ricino hidrogenado de polioxilo 40 (vendido bajo el nombre comercial Cremophor RH40®), aceite de ricino de polioxilo 35 (vendido bajo el nombre comercial Cremophor® EL), ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno (polisorbatos), poloxámeros (Pluronic®), vitamina E-TPGS 1000 (VE-TPGS 1000), éteres de alquilo de polioxietileno, Solutol® HS-15, Tagat® TO, Peglicol 6-oleato, estearatos de polioxietileno, o glicéridos poliglicolizados saturados, todos los cuales están disponibles comercialmente. Los tensioactivos preferidos incluyen aceite de ricino hidrogenado de polioxilo 40 (Cremophor® RH40®), aceite de ricino hidrogenado de polioxilo 35 (Cremophor® EL), ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno (polisorbatos), poloxámeros (Pluronic®), y vitamina E-TPGS 1000. La cantidad total de tensioactivo presente en la composición será generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 700 mg/g, y preferiblemente de aproximadamente 300 a aproximadamente 500 mg/g.

- 40 **[0300]** Preparación de microemulsiones que contienen mirceno polimérico se puede realizar disolviendo los mircenos poliméricos en una cantidad apropiada de aceite tal como triglicéridos de cadena media (Migliol) en un vial adecuado. A continuación, se tapa el vial. El vial se puso en un baño de agua de alrededor de 50 a 60°C y se agita suavemente hasta que todo el material de la droga se disuelve completamente. Después de que el vial se enfrió a temperatura ambiente, una cantidad apropiada de agente tensioactivo (tal como Cremophor® EL o VE-TPGS) se añade y se sigue de la mezcla de mono- y di-glicéridos de ácidos grasos, en su caso. El vial se tapó y se colocó a continuación en el baño de agua de aproximadamente 50-60°C. El vial se agita suavemente para obtener una solución clara y uniforme. Esta solución se puede llenar en cápsulas de HPMC y se almacenó a temperatura ambiente antes de la dosificación oral. Alternativamente, los polvos de polímeros sustituidos (tales como HPMC) pueden añadirse a la solución con agitación adecuada (es decir, agitación) para obtener una suspensión de polímero uniforme. La composición resultante puede llenarse en cápsulas de gelatina, ya sea de gelatina blanda o dura y se almacenó a temperatura ambiente antes de la dosificación oral. Alternativamente, la formulación de microemulsión puede utilizarse como una membrana 0,2um tópica o filtrada a administrarse por vía parenteral.

- 55 **[0301]** Las microemulsiones que contienen mircenos poliméricos tienen buenas propiedades de dispersabilidad en agua y auto-emulsionan cuando se diluyen en medio acuoso para formar micelas nanométricas pequeñas con biodisponibilidad mejorada.

- 60 **[0302]** Ha de entenderse que la fraseología o terminología empleada en el presente documento es para el propósito de descripción y no de limitación. Los medios, materiales, y pasos para llevar a cabo diversas funciones descritas pueden adoptar una variedad de formas alternativas sin apartarse de la invención.

65

Reivindicaciones

1. Una fracción aislada de la goma de masilla, comprendiendo la fracción el mirceno polimérico y siendo obtenible por:

- 5 a) poner en contacto la goma de masilla con al menos un disolvente orgánico polar;
 b) aislar una fracción que es soluble en el al menos un disolvente orgánico polar;
 c) tratar la fracción soluble obtenida en la etapa b) con al menos un disolvente orgánico no polar seleccionado de un C₅-C₁₀-alcano,
 10 d) aislar una fracción que es soluble en dicho disolvente orgánico no polar, en el que los pasos a) a b) y c) a d) se llevan a cabo cada uno independientemente de un número de ciclos,

en el que la fracción está sustancialmente desprovista de compuestos que son solubles en dicho disolvente orgánico polar pero insoluble en dicho disolvente orgánico no polar,

15 en el que al menos un disolvente orgánico polar es un alcohol seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, sec-butanol, t-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, neopentanol, 3-metilo-1-butanol, 2-metilo-1-butanol, 3-metilo-2-butanol, 2-metilo-2-butanol, etilenglicol, y éter de monometilo de etilenglicol, y mezclas de los mismos,

20 para su uso en el tratamiento de una función neurológica alterada, en la que la función neurológica alterada comprende una disminución de una función seleccionada del grupo que consiste de la función cognitiva, la función sensorial, la función motora y combinaciones de los mismos.

2. La fracción aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el mirceno polimérico se selecciona del grupo que consiste en β -mirceno polimérico (poli- β -mirceno), α -mirceno polimérico (poli- α -mirceno), copolímeros de mirceno y combinaciones de los mismos.

3. La fracción aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el poli- β -mirceno se selecciona del grupo que consiste en cis-1,4-poli- β -mirceno, trans-1,4-poli- β -mirceno, 3,4-poli- β -mirceno, 1,2-poli- β -mirceno y combinaciones de los mismos.

4. La fracción aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la fracción aislada de la goma de masilla comprende una mezcla de cis-1,4-poli- β -mirceno y trans-1,4-poli- β -mirceno, y en la que comprende la mezcla de al menos 75% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno.

5. La fracción aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la fracción aislada de la goma de masilla comprende al menos 75% (en peso) de cis-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular de promedio en número en el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 20.000, preferiblemente en el que el peso molecular promedio en número está en el intervalo de al menos aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000.

6. La fracción aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la función neurológica alterada está asociada con una afección seleccionada del grupo que consiste de un traumatismo, demencia vascular, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson y derrame cerebral; o que está adaptado para administración oral, parenteral, tópica o transdérmica.

7. La fracción aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la fracción aislada de la goma de masilla está adaptado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, intracerebral, intracerebroventricular, intraósea e intratecal; o en la que la fracción aislada de la goma de masilla está adaptada para aplicación tópica seleccionada de dérmica, vaginal, rectal, de inhalación, intranasal, ocular, bucal y auricular.

8. La fracción aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el disolvente orgánico no polar se selecciona del grupo que consiste en pentanos, hexanos, heptanos, octanos, nonanos, decanos, y sus mezclas.

9. El mirceno polimérico para su uso en el tratamiento de una alteración de la función neurológica, en el que la función neurológica alterada comprende una disminución de una función seleccionada del grupo que consiste de la función cognitiva, la función sensorial, la función motora y sus combinaciones.

10. El mirceno polimérico para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en una composición, en la que la composición comprende de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25% (en peso) de mirceno polimérico basado en el peso total de la composición.

11. El mirceno polimérico para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el mirceno polimérico comprende cis-1,4-poli- β -mirceno.

12. El mirceno polimérico para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la composición está adaptada para la administración oral, tópica, parenteral, y la administración transdérmica; o en el que el mirceno polimérico se deriva de una fuente de planta.

5 13. El mirceno polimérico para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el mirceno polimérico se selecciona del grupo que consiste de β -mirceno polimérico (poli- β -mirceno), α -mirceno polimérico (poli- α -mirceno), copolímeros de mirceno y combinaciones de los mismos.

10 14. La fracción aislada según la reivindicación 1, en la que el disolvente polar es etanol y en la que el disolvente no polar es hexano.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

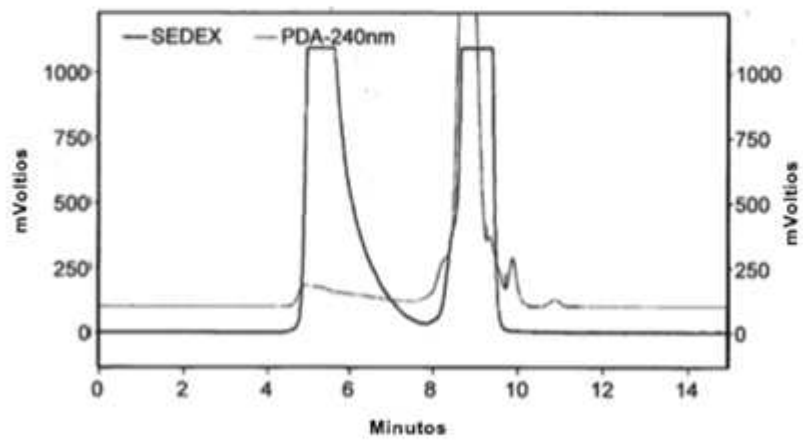


FIGURA 1

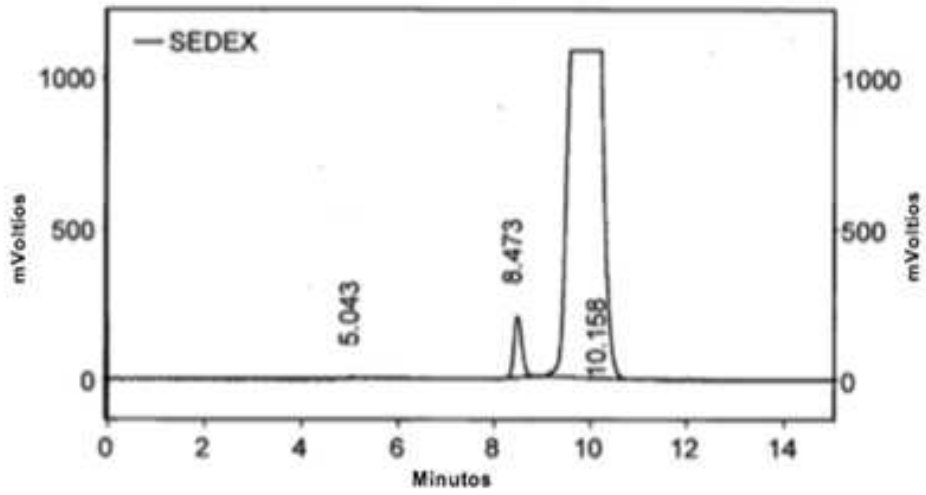


FIGURA 2A

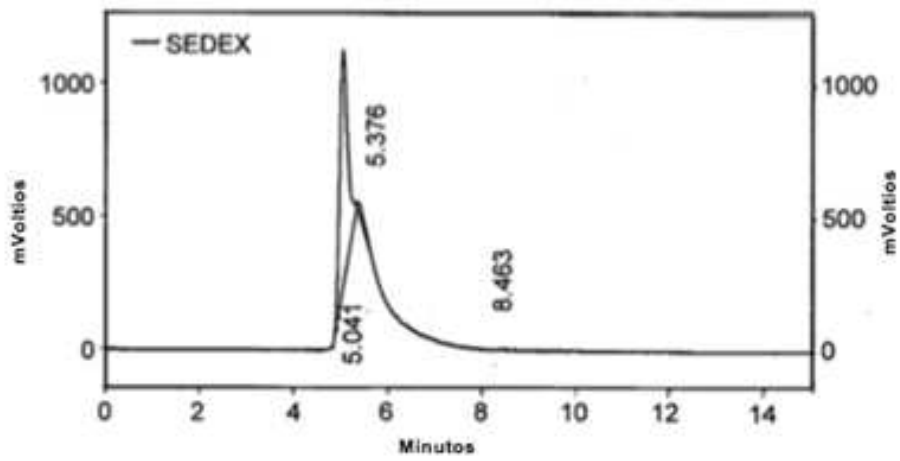


FIGURA 2B

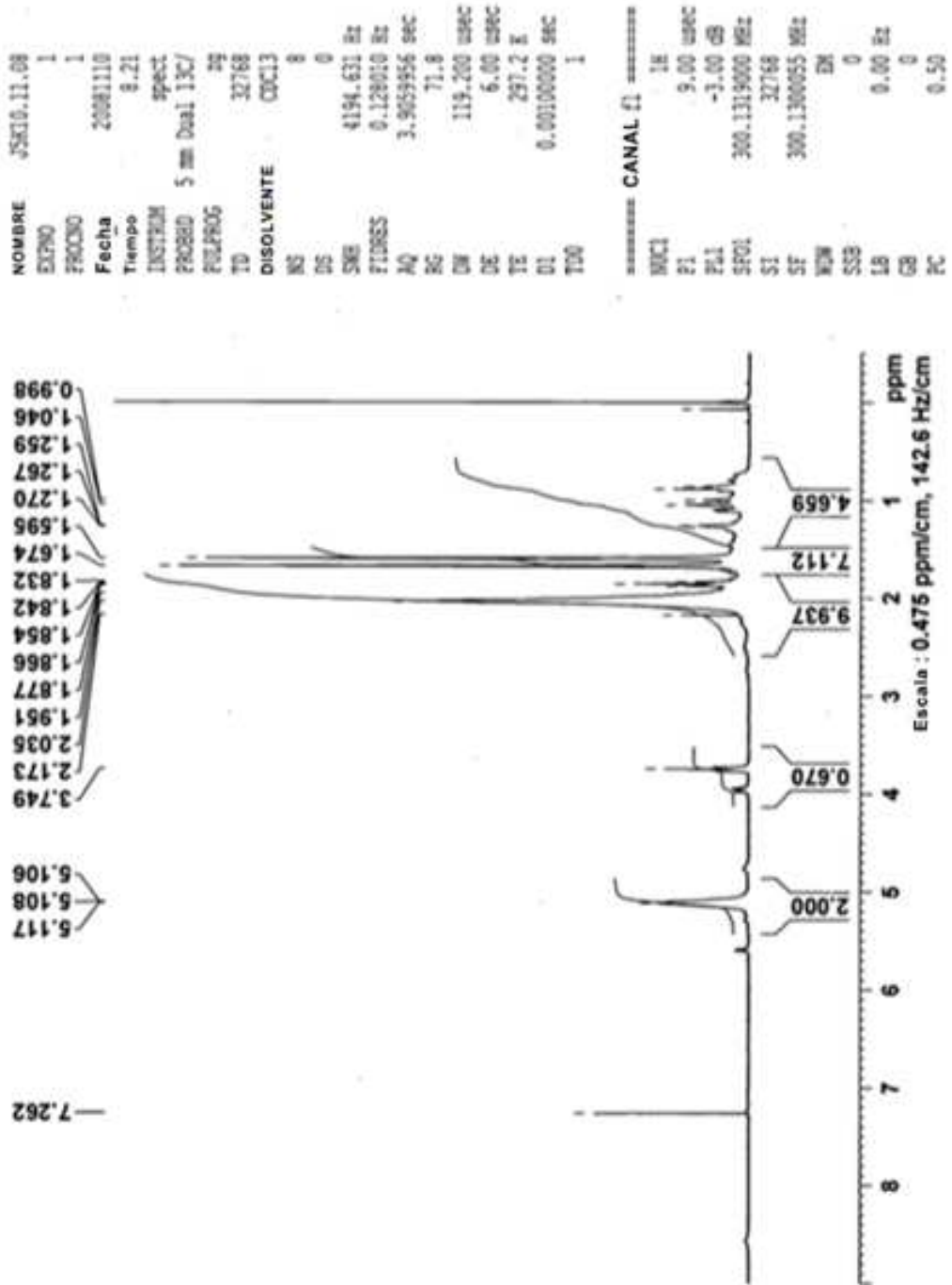


FIGURA 3

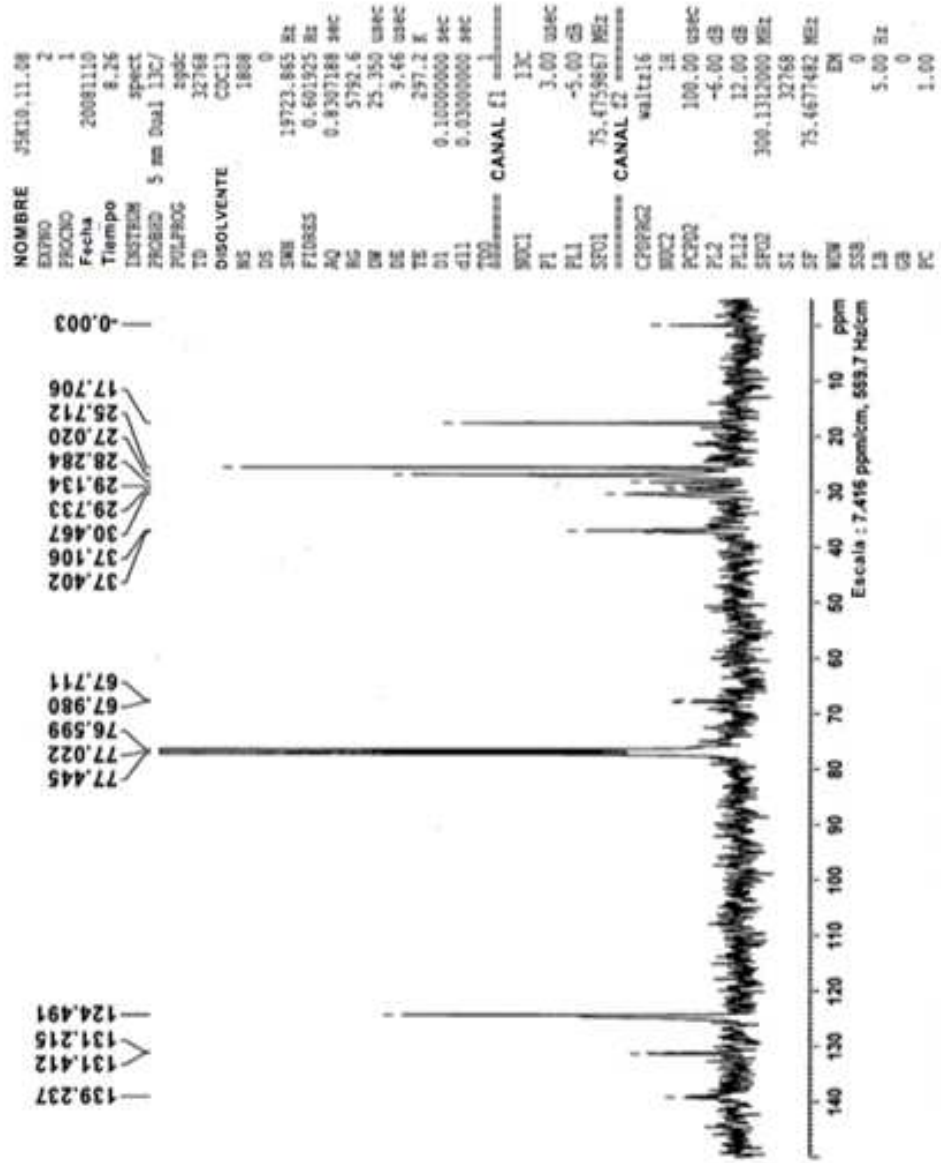


FIGURA 4

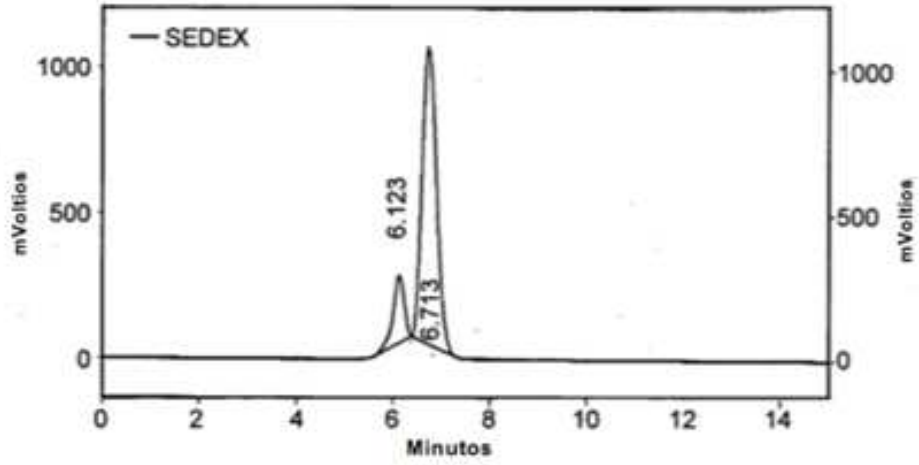


FIGURA 5A

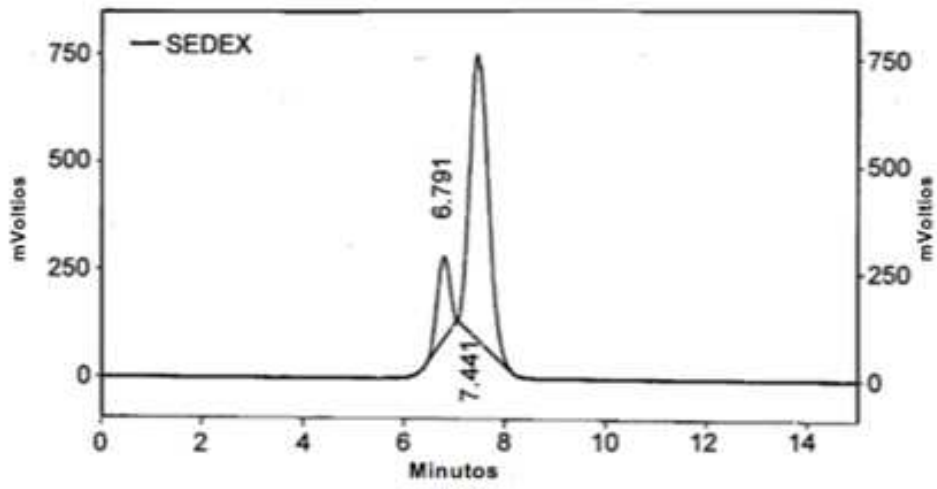


FIGURA 5B

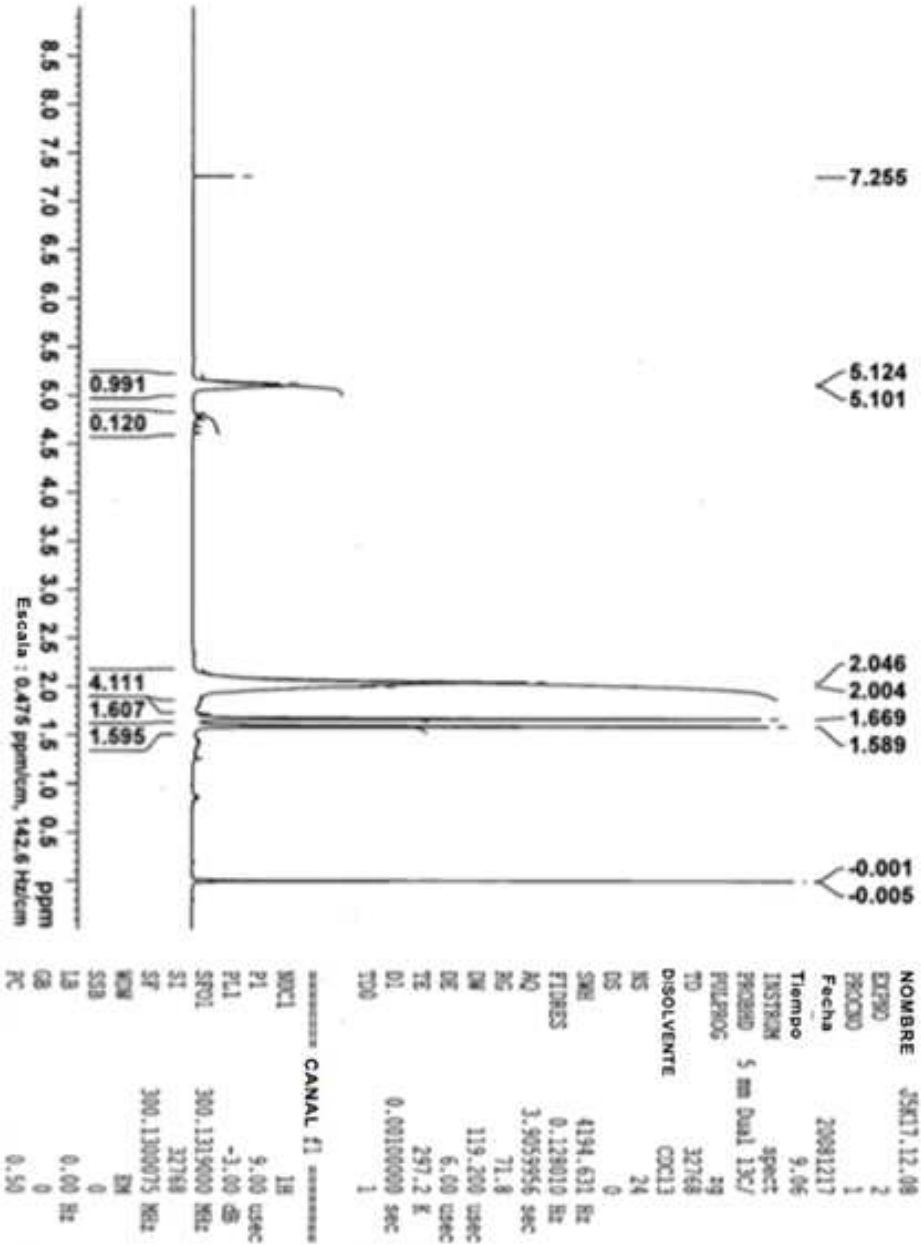


FIGURA 8

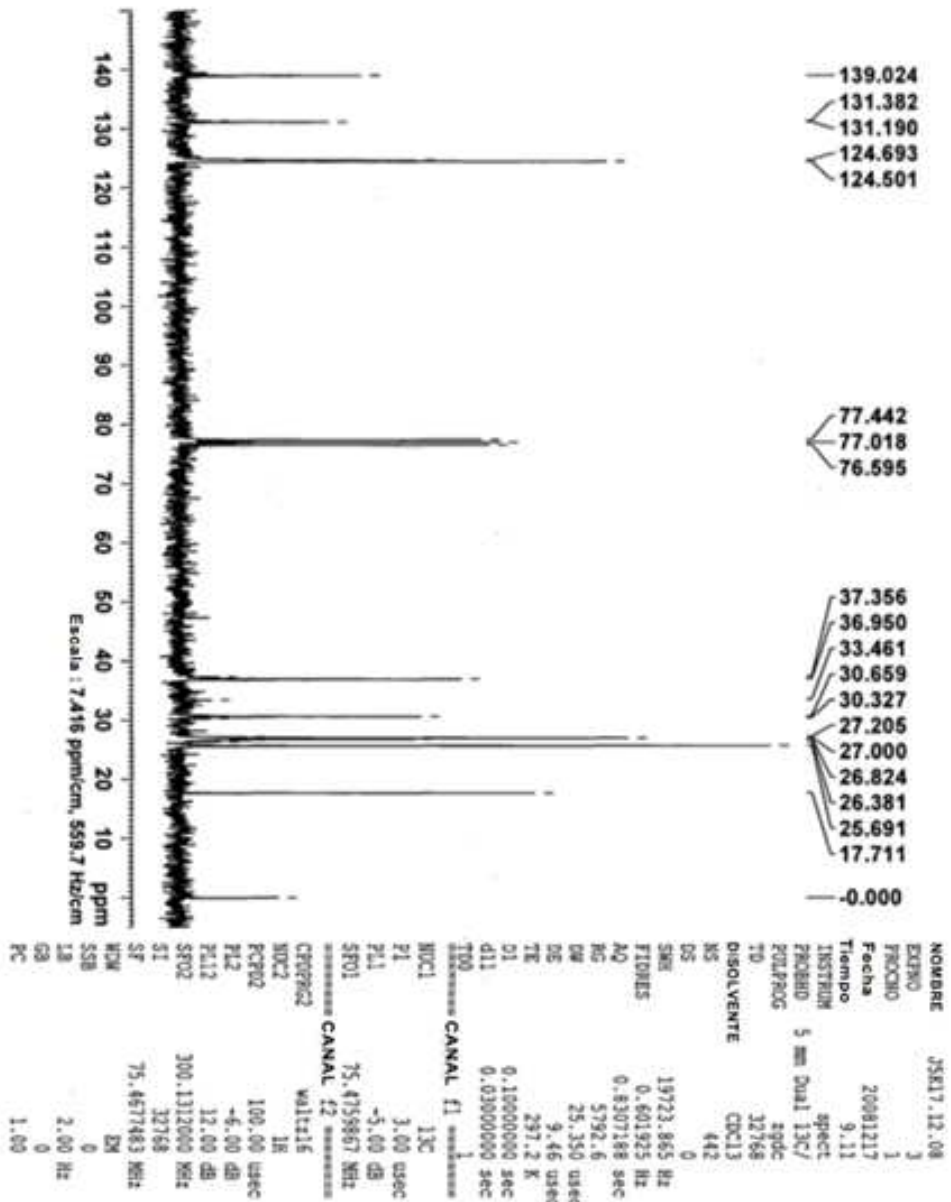


FIGURA 7

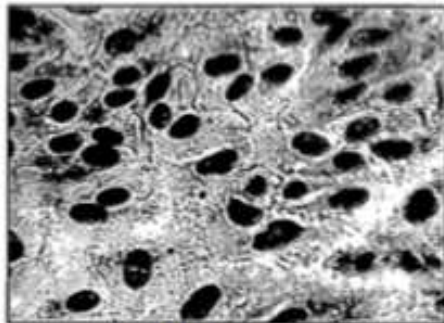


FIGURA 8A

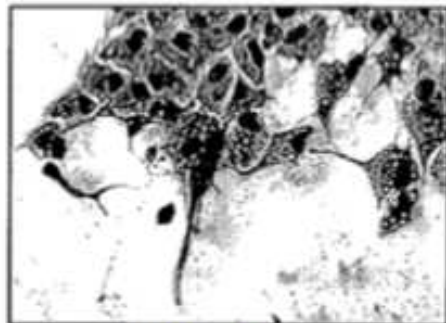


FIGURA 8B

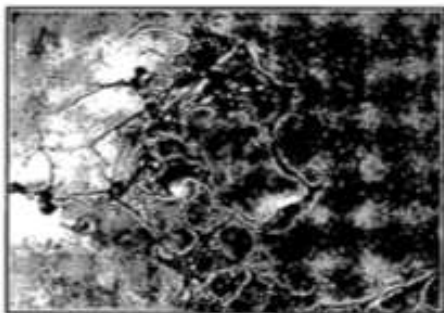


FIGURA 8C

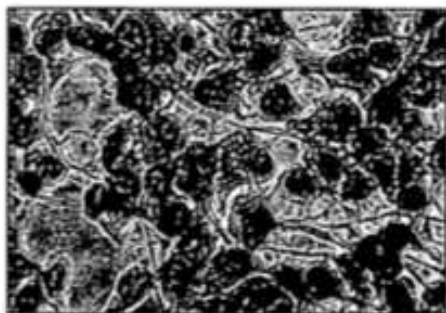


FIGURA 8D

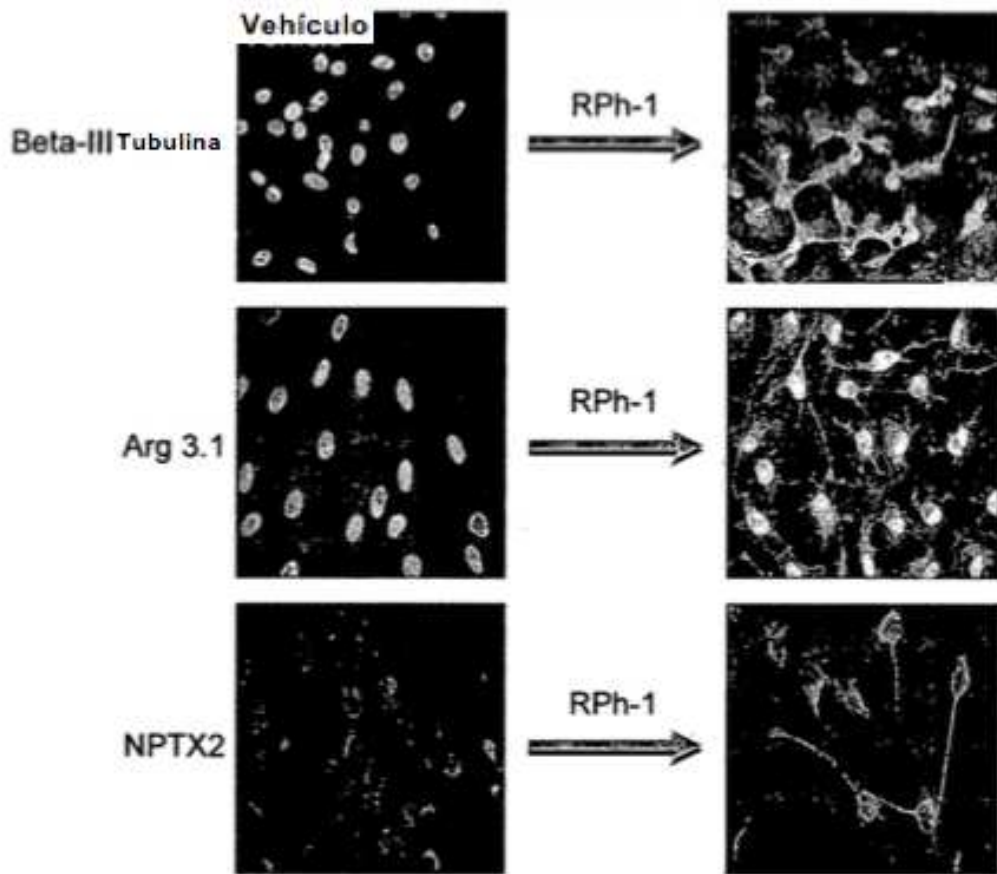


FIGURA 9

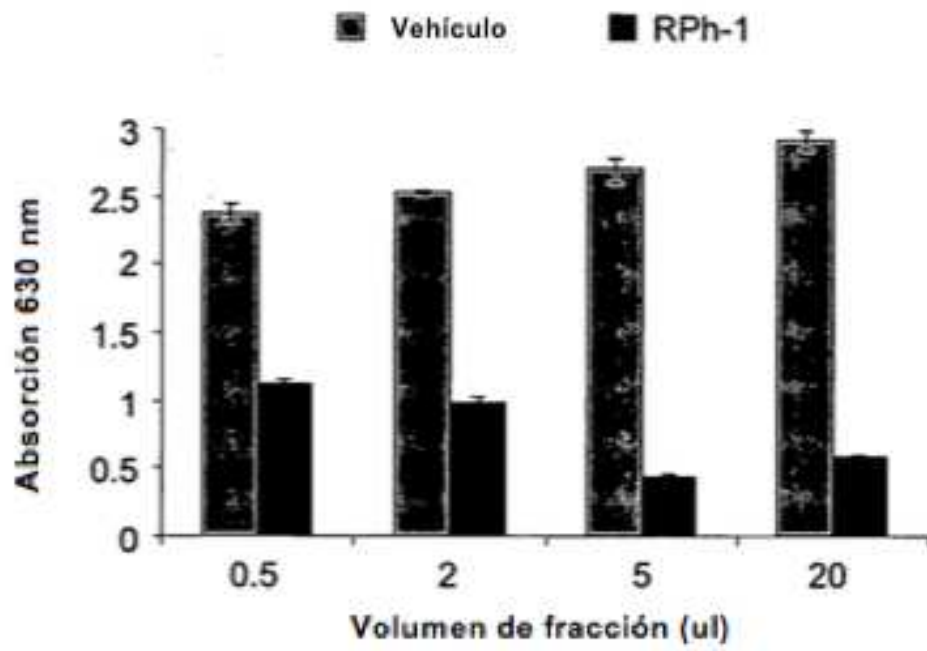


FIGURA 10

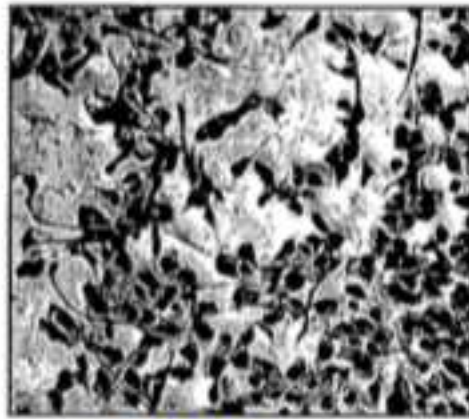


FIGURA 11A

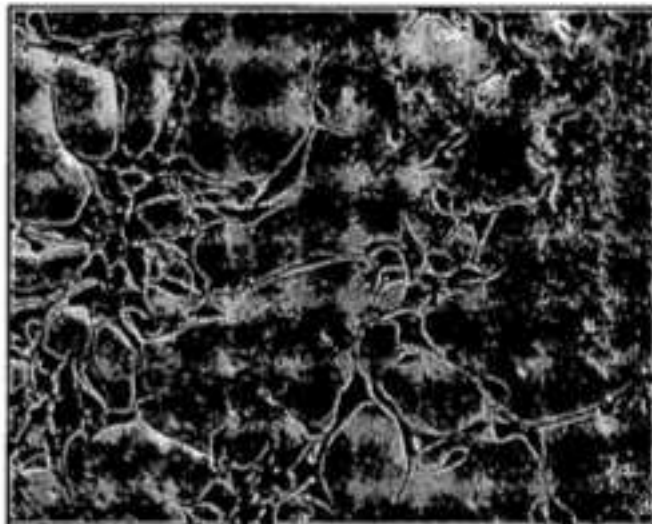


FIGURA 11B

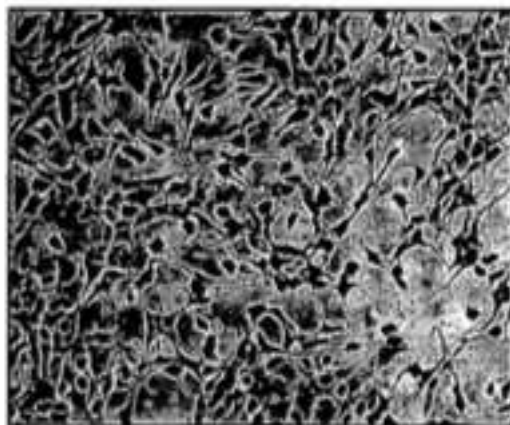


FIGURA 11C

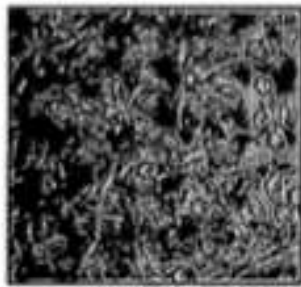


FIGURA 12A



FIGURA 12B

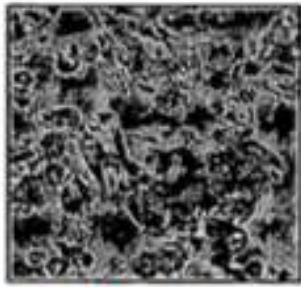


FIGURA 12C

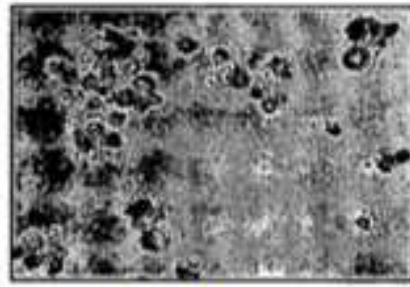


FIGURA 12D

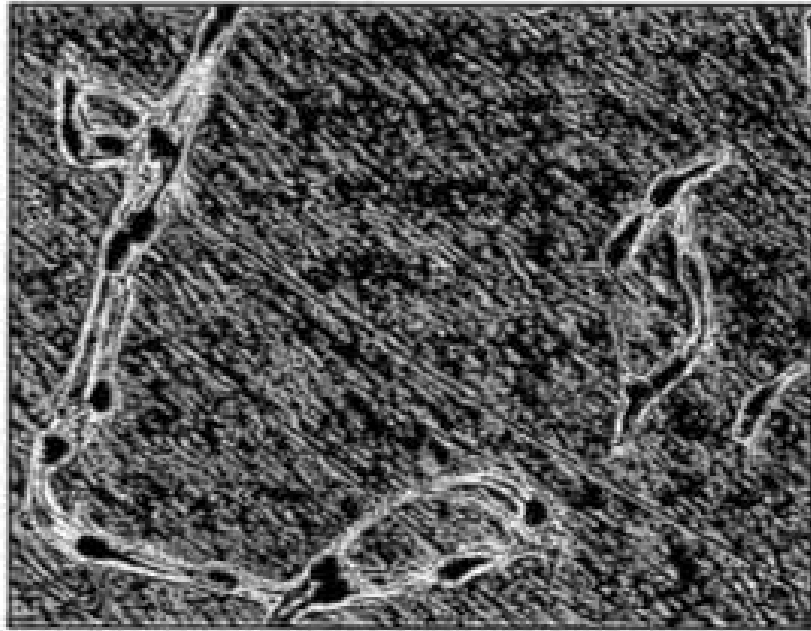


FIGURA 13A

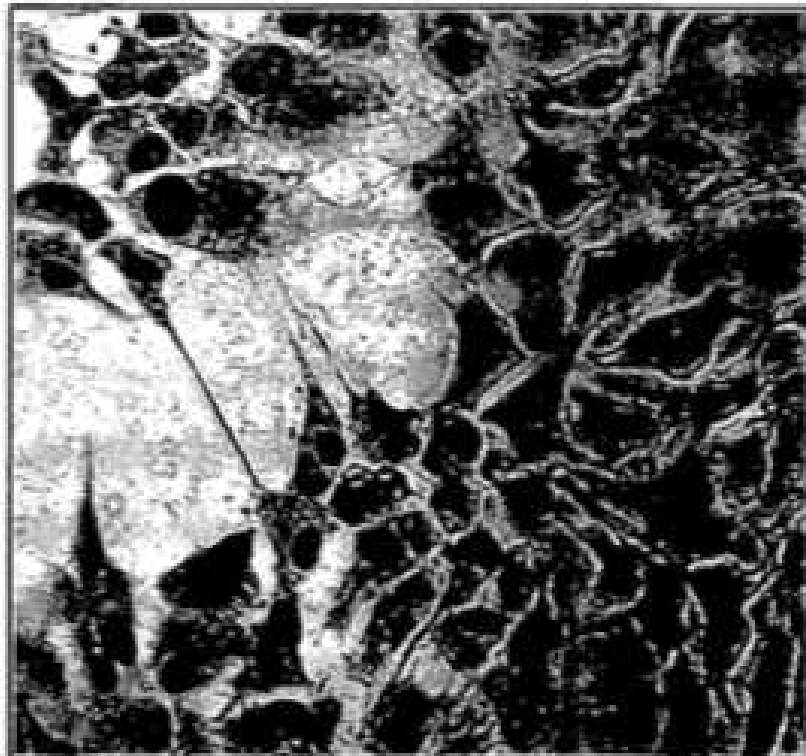


FIGURA 13B



FIGURA 14A



FIGURA 14B

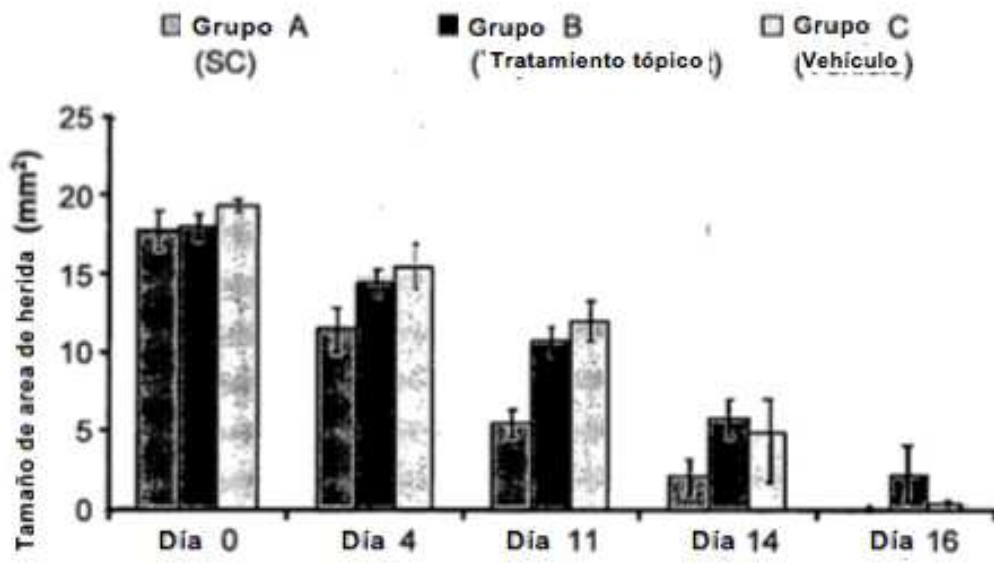


FIGURA 15

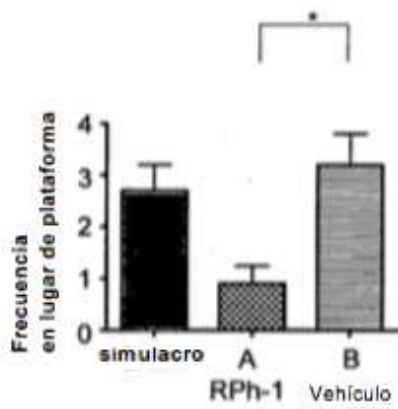


FIGURA 16A

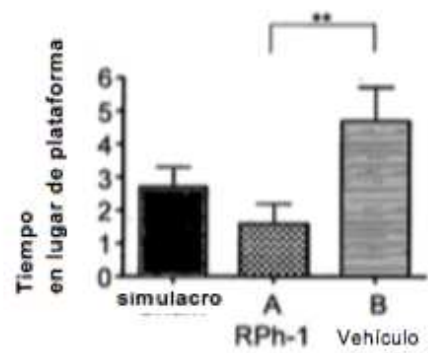


FIGURA 16B

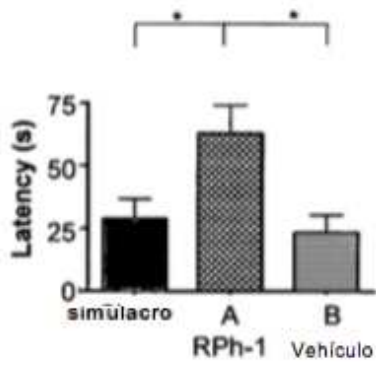


FIGURA 16C

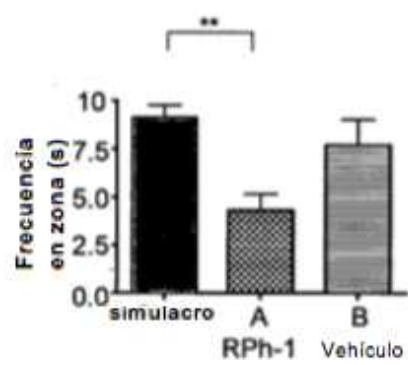


FIGURA 16D

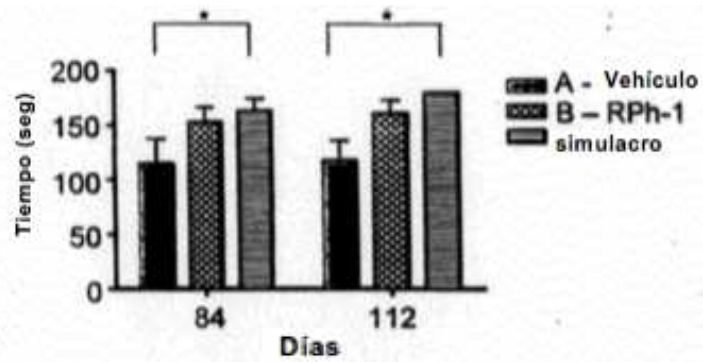


FIGURA 16E

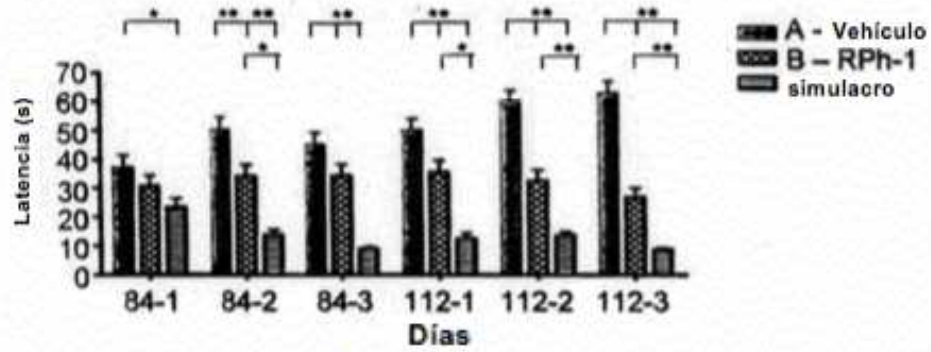


FIGURA 16F

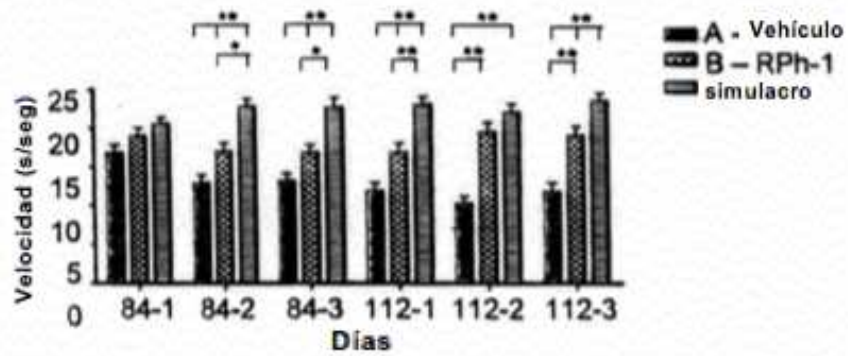


FIGURA 16G

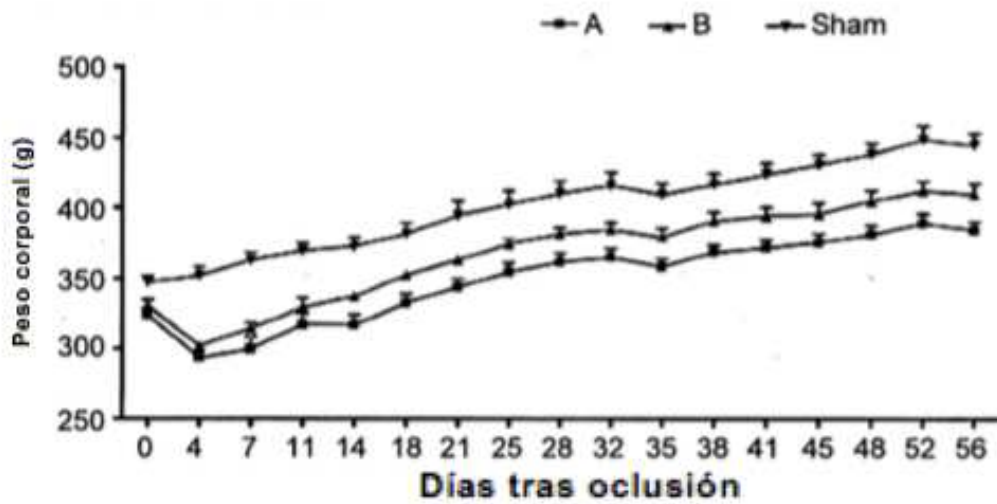


FIGURA 17A

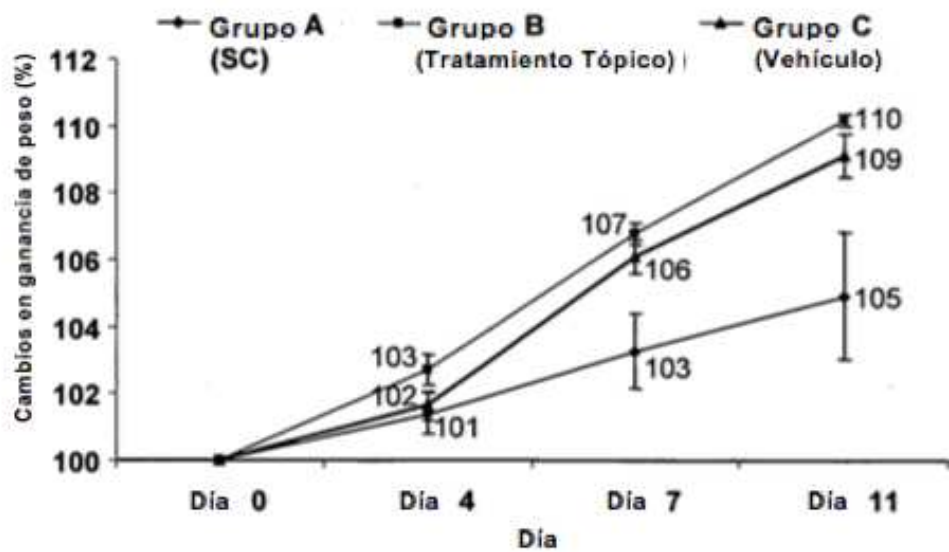


FIGURA 17B

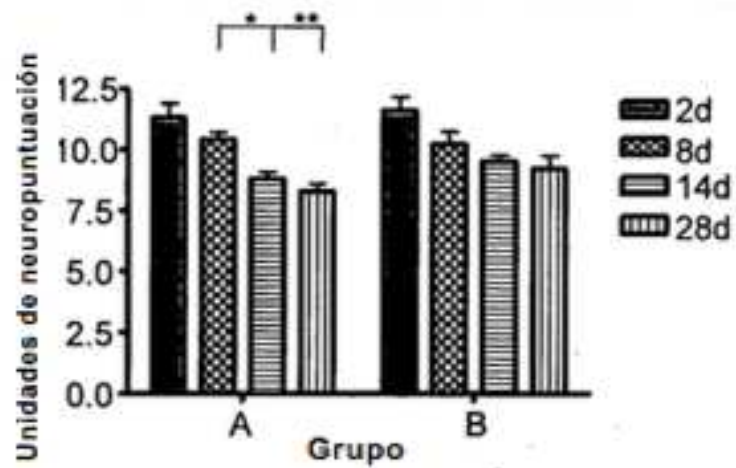


FIGURA 18A

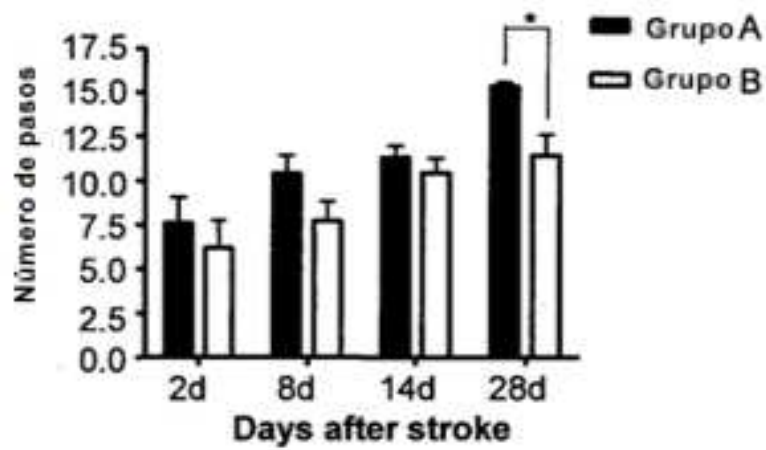


FIGURA 18B

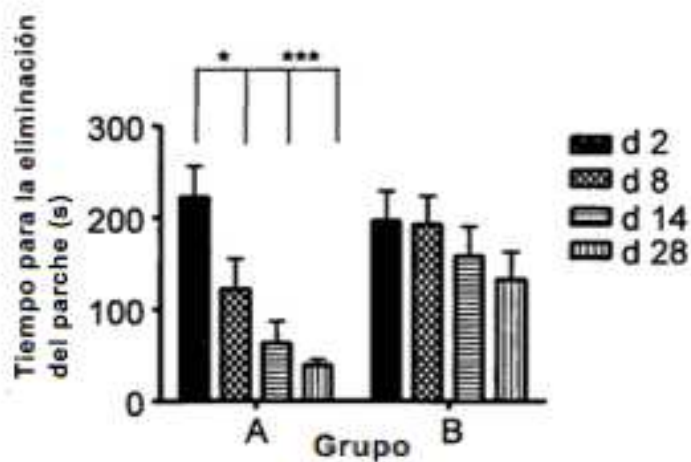


FIGURA 18C

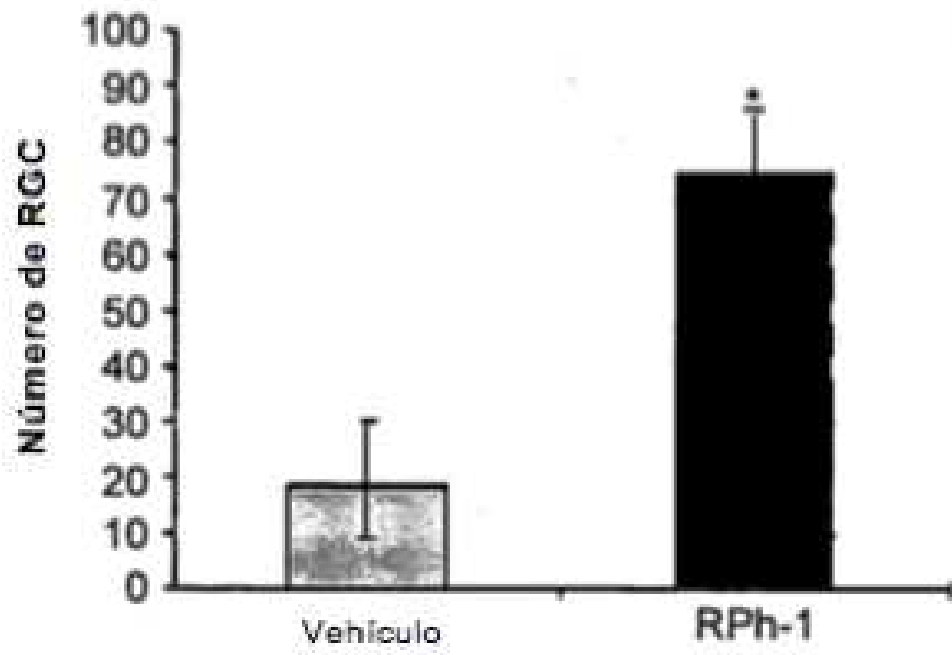


FIGURA 19

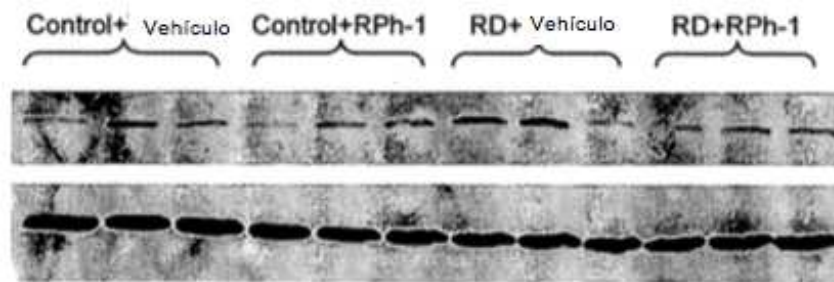


FIGURA 20A

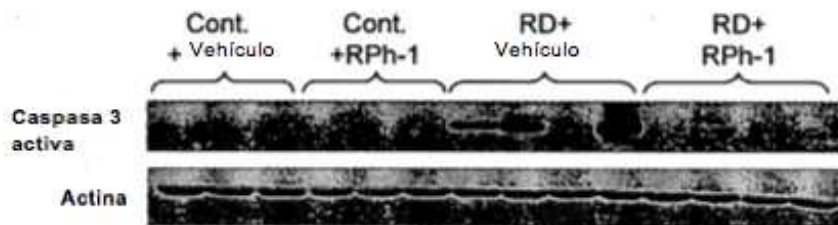


FIGURA 20B