

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 761**

21 Número de solicitud: 201630015

51 Int. Cl.:

C08G 63/08 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

12.01.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.07.2017

71 Solicitantes:

**CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA EN
RED (10.0%)**

**Instituto de Salud Carlos III, Pabellón 11 planta
baja C/ Monforte de Lemos 3-5**

28029 Madrid ES y

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS (90.0%)

72 Inventor/es:

PONS BIESCAS, Antoni;

SUREDA GOMILA, Antoni;

TUR MARÍ, Josep Antoni;

MARTORELL PONS, Miquel y

CAPÓ FIOL, Xavier

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende 5-dodecanolida, su preparación y su uso**

57 Resumen:

Composición farmacéutica que comprende 5-dodecanolida, su preparación y su uso.

La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende como principio activo la 5-dodecanolida. Este principio activo ha sido aislado de la manteca del cerdo a través un tratamiento específico. Así pues la presente invención también se refiere a un procedimiento para obtener la composición de la invención así como al uso de la misma con fines terapéuticos y más particularmente con el fin de tratar procesos inflamatorios.

ES 2 623 761 A1

DESCRIPCION

Composición farmacéutica que comprende 5-dodecanolida, su preparación y su uso.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de las composiciones farmacéuticas con actividad antiinflamatoria. Más particularmente se refiere a una composición farmacéutica que comprende como principio activo la 5-dodecanolida. Este principio activo ha sido aislado de la manteca del cerdo a través un tratamiento específico. Así pues la presente invención también se refiere a un procedimiento para obtener la composición de la invención así como al uso de la misma con fines terapéuticos y más particularmente con el fin de tratar procesos inflamatorios.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata y preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunitarias de los tejidos cercanos. La inflamación provoca una gran dilatación de los vasos sanguíneos junto con una apertura de sus poros, incrementando su permeabilidad y permitiendo el paso de líquido, sustancias y células desde la sangre a los tejidos, por lo que éstos aumentan de volumen y temperatura. La finalización de la inflamación no es un proceso pasivo, sino que puede estar mediado por la síntesis de diversas moléculas derivadas de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados como el eicosapentaenoico y el docosahexaenoico. Entre estas moléculas encontramos las resolvinas y los hidroxí-derivados de la oxidación de ácidos grasos omega-3 de cadena larga (18, 20, 22 carbonos) (Patente US 2009/0180961 A1), o derivados sintéticos de éstos (Patente MX 2011010827). Su composición permite que se puedan administrar en forma de partículas y nanopartículas para finalizar la inflamación (WO2012135032 (A2)).

35

La inflamación está descrita ya en papiros egipcios 3000 años a.C. Celsus (escritor romano), durante el primer siglo d.C, expone sus signos cardinales: Rubor, Tumor, Calor y Dolor. Seguidamente, Virchow expuso el quinto signo: limitación funcional. En 1793, el cirujano escocés John Hunter planteó que "no es una enfermedad sino una respuesta no específica que tiene un efecto saludable sobre el huésped". En 1839-1884, Julius Cohnheim describió los primeros hallazgos microscópicos de esta respuesta de defensa: aumento de la permeabilidad vascular y migración leucocitaria. Posteriormente, Elie Metchnikoff concluyó que el proceso de la inflamación genera leucocitos y anticuerpos para la defensa contra los microorganismos, estableciéndose desde entonces la relación INFLAMACIÓN + INFECCIÓN; es decir, cuando las bacterias entran en el organismo producen una infección y el cuerpo en su defensa genera una inflamación. Más aún, Sir Thomas Lewis, quien sobre las bases de experimentos simples de la respuesta inflamatoria realizados en piel, estableció que "sustancias químicas, tales como la histamina, localmente inducidas por el daño, median los cambios vasculares de la inflamación", este concepto fundamenta el descubrimiento importante de mediadores químicos de la inflamación y el uso potencial de agentes antiinflamatorios.

De forma general podemos dividir la inflamación en cinco etapas:

1- Liberación de mediadores. Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas bajo la actuación de determinados estímulos. Los tejidos al lesionarse van a liberar mediadores de la inflamación.

Entre los mediadores destacan aminas como la histamina o la serotonina, enzimas proteolíticas, el óxido nítrico, citoquinas proinflamatorias (como el factor quimiotáctico del eosinófilo y el factor quimiotáctico del neutrófilo) y heparina.

Otras sustancias de carácter lipídico constituyen un segundo grupo importante de mediadores de la inflamación. Éstas son sustancias sintetizadas *de novo* y derivadas del ácido araquidónico a través de dos vías metabólicas, la de la enzima ciclooxigenasa que determina la producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos y la de la lipooxigenasa que conduce a la formación de leucotrienos (LT).

2- Efecto de los mediadores. Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunitarias al foco inflamatorio. Se produce un aumento de la permeabilidad vascular

favoreciendo la llegada a la zona afectada, desde la sangre, de moléculas y células del sistema inmunitario y se estimulan las terminaciones nerviosas del dolor.

5 3- Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. Desde el punto de vista cronológico, los mediadores de la inflamación van a producir básicamente dos efectos. En una primera fase inicial, alteraciones vasculares que facilitan el trasvase de moléculas desde la sangre al foco inflamatorio, así como la producción de edema. En una segunda fase, más tardía, las propias alteraciones vasculares, así como la liberación en el foco de factores quimiotácticos, determinan la llegada de células inmunes (basófilos, neutrófilos, macrófagos, linfocitos y eosinófilos) procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes.

15 4- Regulación del proceso inflamatorio. Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso. Algunos de los mediadores que producen activación, al variar su concentración o actuar sobre distintos receptores, van a producir inhibición, consiguiendo, de esta forma, un equilibrio o modulación de la respuesta inflamatoria. La síntesis de moléculas, como las resolvinas a partir de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 de los fosofolípidos de membrana, entra en este proceso de finalización de la inflamación.

20 5- Reparación. Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria. Estos procesos integran la llegada a la zona de fibroblastos que van a proliferar y sintetizar colágeno, proliferación de células epiteliales y proliferación de vasos dentro de la herida.

25 Para reducir el proceso inflamatorio se usan básicamente productos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Su funcionamiento se basa en la inhibición de la enzima ciclooxigenasa reduciendo la síntesis de prostaglandinas. Los AINEs constituyen el pilar básico del tratamiento de las enfermedades inflamatorias crónicas, como las tan extendidas artrosis y artritis, que al no tener cura requieren del uso de fármacos para el tratamiento de los síntomas (tratamiento sintomático). Esto significa que disminuyen la rigidez y el dolor por su efecto antiinflamatorio y analgésico, pero no curan ni modifican la enfermedad. Se han identificado otras moléculas, mediadores lipídicos que pueden contribuir a la finalización de la inflamación y cuya función, utilización, síntesis y forma de aplicación han sido
30 previamente patentados (Patente US 2009/0180961 A1; Patente MX 2011010827; WO2012135032 (A2) — 2012-10-04).

Las formas de aplicación tópicas son preparaciones semisólidas y deformables para extender sobre la piel o mucosas. Están formadas por una base o vehículo y el principio activo o medicamento. Las bases o vehículos contienen el principio activo y dan la consistencia de la presentación, su adecuada elección depende del tipo de piel donde se va a aplicar y de las propiedades físico-químicas del medicamento para facilitar su liberación. La finalidad de estos preparados es la penetración de las sustancias activas a través del estrato córneo de la piel con función aislante. La penetración consta de dos fases, absorción, que es el paso del medicamento a través de la piel hasta llegar a nivel de las células. La segunda fase es la difusión, es decir, la propagación a través de los tejidos.

5
10

En el tratamiento por vía tópica se deben cumplir los siguientes requisitos: piel intacta, inflamación de localización superficial y focal, y además, la aplicación debe ser continua. Su uso está indicado en traumatismos, esquinces, contusiones, tendinitis, etc.

15 Dentro de la cultura tradicional, el sebo de cerdo se ha utilizado para el tratamiento de golpes y procesos inflamatorios agudos pero sin que se sepa los componentes que pueden ser responsables de estos efectos antiinflamatorios.

Por otro lado hay descritos en la literatura ejemplos donde la grasa de cerdo se ha usado en la elaboración de composiciones con actividad antiinflamatoria.

20

Por ejemplo, el documento WO2009077635 se refiere a una composición a base de aceite de oliva, manteca de cerdo y miel de abeja en proporciones 1:1:1 y a su uso como antiinflamatorio, anti-edematoso, anti-eritematoso y regenerador de tejidos.

25

El documento JP2009149599 también describe una composición de un aceite medicinal a base de grasas y aceites de cerdo negro alimentado con una dieta suplementada con α -tocoferol útil en el tratamiento cosmético y alimenticio de dermatitis atópica, inflamación, pérdida de cabello y eczema.

30

Por su parte el documento ES2087036 tiene por objeto una pomada de acción rápida contra las varices, que se constituye a base de una mezcla de alcanfor, manteca de cerdo y bicarbonato.

35 US2014377370A1 tiene por objeto una composición homeopática que comprende una grasa animal, entre ellas la manteca de cerdo, cebolla y romero para el tratamiento de

articulaciones con rigidez, dolor, inflamación, calambres, lesiones, gota o rango limitado de movimiento.

Sin embargo, ninguno de los documentos anteriormente descritos hace referencia a por
5 medio de que componentes la grasa de cerdo ejerce un efecto antiinflamatorio.

Los autores de la presente invención han conseguido a partir de un determinado tratamiento de la grasa del cerdo identificar una serie de compuestos con actividad antiinflamatoria. Pero de manera más sorprendente han podido identificar que mediante dicho tratamiento aparece
10 un compuesto un compuesto que no se encuentra en la grasa de cerdo sin tratar y que muestra un efecto antiinflamatorio muy potente. Este compuesto identificado por los inventores es la 5-dodecanolida que es la base de las composiciones de la presente invención.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1: Efectos del ungüento sobre la inflamación inducida con zymosan sobre el diámetro de las patas de las ratas.

20 **Figura 2:** Efectos del ungüento sobre la inflamación inducida con zymosan a las 4 horas sobre el peso de la pata.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 Un primer objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende 5-dodecanolida como principio activo y uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

La composición de la invención se puede preparar a partir del compuesto obtenido
30 comercialmente o por síntesis o a partir de un proceso de tratamiento y purificación de la manteca del cerdo que es a partir de donde los inventores han conseguido aislarlo e identificar su potente actividad antiinflamatoria.

Cuando la 5-dodecanolida se obtiene a partir del tratamiento de la manteca del cerdo que se
35 describirá más adelante se observa que además de la 5-dodecanolida la manteca tratada posee otra serie de compuestos que sirven para potenciar la actividad antiinflamatoria.

Así pues, en una realización particular la composición de la invención comprende además de 5-dodecanolida, uno o más de los compuestos seleccionados entre octadecenamida, resolvina D1, ácido hexadecanoico, ácido 9-octadecenoico, ácido 6-octadecenoico, ácido 9,12-octadecadienoico, ácido octadecanoico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico, ácido 7-hexadecenoico, ácido 11,14-octadecadienoico, hexadecanamida.

La 5-dodecanolida puede estar presente en la composición de la invención en un rango de entre 2-6% del peso total de la composición, preferiblemente entre el 3-5%.

10 En una realización particular la composición de la invención comprende octadecenamida en un porcentaje de 2-8% del peso total de la composición.

En otra realización particular la composición de la invención comprende resolvina D1 en un porcentaje de 1-4% del peso total de la composición.

15

Otra realización particular la composición de la invención comprende ácido hexadecanoico en un porcentaje de 0,01-0,7% del peso total de la composición.

20 Otra realización particular la composición de la invención comprende ácido 9-octadecenoico, ácido 6-octadecenoico o ambos en un porcentaje de 56-65% del peso total de la composición.

Otra realización particular la composición de la invención comprende ácido 9,12-octadecadienoico en un porcentaje de 12-15% del peso total de la composición.

25

Otra realización particular la composición de la invención comprende ácido octadecanoico en un porcentaje de 0,1-0,5% del peso total de la composición.

30 Otra realización particular la composición de la invención comprende ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico en un porcentaje de 5,1-6,3% del peso total de la composición.

Otra realización particular la composición de la invención comprende ácido 7-hexadecenoico en un porcentaje de 1,2-3% del peso total de la composición.

35 Otra realización particular la composición de la invención comprende ácido 11,14-octadecadienoico en un porcentaje de 5,5-6,1% del peso total de la composición.

Otra realización particular la composición de la invención comprende hexadecanamida en un porcentaje de 0,7-1,4% del peso total de la composición.

5 Una realización particular viene representada por una composición que comprende en porcentaje en peso con respecto al total de la composición:

- a) 4,34-4,63% de 5-dodecanolida
- b) 0,05-0,7% de ácido hexadecanoico
- c) 59,4-63,7% de ácido 9-octadecenoico o ácido 6-octadecenoico
- 10 d) 12,5-14% de ácido 9,12-octadecadienoico
- e) 0,13-0,47% de ácido octadecanoico
- f) 5,32-6,21% de ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico
- g) 1,33-2,83% de ácido 7-hexadecenoico
- h) 5,67-6,00% de ácido 11,14-octadecadienoico
- 15 i) 0,89-1,28% de hexadecanamida
- j) 3,19-6,84% de octadecenamida
- k) 1,93-3,02% de resolvina D1.

La composición de la invención además comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dependiendo de la vía de administración se pueden usar unos u otros excipientes o vehículos farmacéuticos que son ampliamente conocidos para un experto en la materia como por ejemplo materiales de soporte, lubricantes, cargas, disolventes, diluyentes, colorantes, acondicionadores del aroma y el sabor tales como azúcares, antioxidantes, ceras o ésteres de ácidos grasos, conservantes, emulsionantes y/o aglutinantes. La selección de estos aditivos auxiliares o vehículos y las cantidades que van a usarse dependerán de la forma de forma de administración de la composición farmacéutica.

La forma de administración preferida en por vía tópica y en este sentido la forma preferida de la composición de la invención incluye ungüentos, pomadas, geles, cremas, lociones, suspensiones o emulsiones. La realización preferida de la invención implica la composición en forma de ungüento.

Un segundo objeto de la invención es un procedimiento para obtener una composición de acuerdo con la invención que comprende:

- 35 a) Extracción de la manteca de cerdo

- b) Trituración de la manteca
- c) Cocción de la manteca triturada
- d) Separación por tamizado de la manteca líquida de los chicharrones
- e) Opcionalmente, extracción hidroalcohólica de la manteca líquida

5

Antes de llevar a cabo la primera etapa del procedimiento de se lleva a cabo el despiece del cerdo.

La primera etapa comprende la extracción de la manteca del cerdo. La manteca de cerdo se obtiene de la panceta y del tejido adiposo de la región del epiplón. Se separa la parte magra del tocino blanco y la grasa adherida al epiplón. La alimentación del cerdo tiene importancia determinando la cantidad y composición de grasa acumulada por el animal.

En un segundo paso la manteca de cerdo formada por el tocino blanco y la grasa del epiplón se trituran por medios mecánicos como, por ejemplo, en una trituradora de carne con un disco de picado de orificios grandes (diámetro de unos 2 cm). Una vez triturados, el tocino y la grasa del epiplón se mezclan hasta conseguir una masa homogénea, aunque no demasiado triturada. Aproximadamente se obtienen unos 20 Kg. de masa por animal.

A continuación la manteca triturada se somete a cocción. Par ello la manteca se introduce preferiblemente en una caldera de acero inoxidable para su cocción a fuego fuerte. La grasa se remueve constantemente durante todo el proceso de cocción con una cuchara de madera, para evitar que la grasa se pegue en el fondo de la caldera y se quemé. Durante el proceso de cocción la grasa se licua y posteriormente alcanza la ebullición (60-80°C). El tiempo promedio de cocción para unos 20 Kg de grasa es de unos 50 minutos a fuego fuerte, hasta que los chicharrones estén cocidos y adquieran un color dorado intenso, lo que puede pasar tras 90 minutos de cocción. Durante esta cocción se producen y liberan los principios anti-inflamatorios. La producción de los componentes con carácter antiinflamatorio puede incrementarse, incrementando la proporción de proteína y utilizando grasa procedente de cerdos con una alimentación suplementada con ácidos grasos poliinsaturados omega 3.

Una vez la manteca está cocida, se saca del fuego y se deja reposar en la misma cazuela. Cuando ha enfriado lo suficiente se pasa por un tamiz con el fin de separar los chicharrones de la manteca líquida. Posteriormente, estando aun la manteca líquida se puede o bien utilizar en el paso siguiente del procedimiento o almacenarse en recipientes de cristal donde termina de enfriarse y se solidifica para su uso opcional en la etapa de extracción hidroalcohólica.

La extracción hidroalcohólica y purificación de los principios activos es opcional aunque recomendable ya que permite una mayor concentración de los compuestos con actividad antiinflamatoria. Para obtener el extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo se funde y se añade una mezcla de alcohol:agua (65:35, v:v), preferiblemente metanol:agua (65:35, v:v) y un ácido concentrado preferiblemente HCl 1M. Se agita vigorosamente con ayuda mecánica y se separan las fases por centrifugación. Seguidamente se purifican los principios antiinflamatorios mediante una extracción en fase sólida en la que los principios activos antiinflamatorios se adsorben a un material hidrofóbico que se lava con agua, hexano y finalmente se desadsorben y liberan con metilformiato.

10

El extracto hidroalcohólico obtenido por este procedimiento posee además de 5-dodecanolida los siguientes compuestos: octadecenamida, resolvina D1, ácido hexadecanoico, ácido 9-octadecenoico, ácido 6-octadecenoico, ácido 9,12-octadecadienoico, ácido octadecanoico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico, ácido 7-hexadecenoico, ácido 11,14-octadecadienoico, hexadecanamida.

15

El extracto obtenido se puede utilizar directamente como ungüento para aplicación tópica o puede procesarse para su formulación como composición farmacéutica adaptado a cualquier vía de administración tal y como se ha explicado antes.

20

Por otro lado, hay que señalar que tanto el sebo de cerdo tratado, como el extracto hidroalcohólico contienen principios antiinflamatorios que pueden utilizarse directamente o bien introducirse en diversos vehículos de aplicación sobre las zonas inflamadas. Estos vehículos de aplicación pueden ser ungüentos, pomadas, disoluciones, pulverizaciones, etc.

25

Alternativamente se puede preparar la composición de la invención utilizando 5-dodecanolida sintetizada o purificada de otras fuentes diferentes del sebo de cerdo o una mezcla de esta con uno o más de los siguientes compuestos: octadecenamida, resolvina D1, ácido hexadecanoico, ácido 9-octadecenoico, ácido 6-octadecenoico, ácido 9,12-octadecadienoico, ácido octadecanoico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico, ácido 7-hexadecenoico, ácido 11,14-octadecadienoico, hexadecanamida.

30

Un último objeto de la presente invención viene representado por el uso de la composición de la invención.

De manera general la composición de la invención tiene su aplicación en el tratamiento de la inflamación.

35

De manera más específica la composición de la invención puede usarse para el tratamiento de la inflamación asociada a enfermedades articulares como la artritis o artrosis. Así también y, dado que se ha demostrado eficaz en la reducción del proceso inflamatorio iniciado por fragmentos de las paredes celulares de microorganismos como *e. coli*, también puede usarse para el tratamiento de la inflamación asociada a enfermedades infecciosas como la que se produce en la mastitis que obstruye algún conducto galactóforo causado por infecciones bacterianas con capacidad de hacer biofilms durante la lactancia. Así mismo, puede disminuir la inflamación asociada al acné que también es consecuencia de la actividad bacteriana.

5

En cualquier caso la composición de la invención se usa de manera preferente para el tratamiento de la inflamación por vía tópica ya sea en forma de ungüento, pomada, gel, crema, loción, suspensión o emulsión, y por tanto, la composición de la invención se hace especialmente útil en el tratamiento inflamaciones a nivel superficial como traumatismos, esguinces, contusiones o tendinitis.

10

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra mejor mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitadores de su alcance. Así, por ejemplo, las concentraciones concretas y la naturaleza de los ingredientes y aditivos descrita en los ejemplos pueden extenderse a otros y a otras concentraciones. La raza de cerdo utilizada para la obtención del producto así como su proceso de engorde pueden variar y no son limitantes de la invención. La maquinaria e instrumentos que se utilizan en los ejemplos pueden variar y no son limitantes de la invención.

20

EJEMPLO 1

En este ejemplo se ilustra una realización de como se obtiene tanto el sebo de cerdo tratado así como el extracto hidroalcohólico a partir de este extracto.

En primer lugar se llevó a cabo el despiece del cerdo.

30

A continuación se obtuvo la manteca de la panceta y del tejido adiposo de la región del epiplón. Se separa la parte magra del tocino blanco y la grasa adherida al epiplón.

La manteca de cerdo formada por el tocino blanco y la grasa del epiplón se trituraron en una trituradora de carne con un disco de picado de orificios grandes (diámetro de unos 2 cm).

35

Una vez triturados, el tocino y la grasa del epiplón se mezclaron hasta conseguir una masa homogénea, aunque no demasiado triturada. Aproximadamente se obtuvieron unos 20 Kg. de masa por animal.

5 A continuación la manteca triturada se sometió a cocción en una caldera de acero inoxidable para su cocción a fuego fuerte. La grasa se removió constantemente durante todo el proceso de cocción con una cuchara de madera, para evitar que la grasa se pegara en el fondo de la caldera y se quemara. Durante el proceso de cocción, la grasa se licuó y posteriormente alcanzó la ebullición (60-80°C). La manteca se coció durante 90 minutos
10 momento en el cual los chicharrones quedaron cocidos y adquirieron un color dorado intenso.

Una vez la manteca estuvo cocida, se sacó del fuego y se dejó reposar en la misma cazuela. Cuando se enfrió lo suficiente se pasó por un tamiz con el fin de separar los
15 chicharrones de la manteca líquida. Estando aun la manteca líquida se almacenó en recipientes de cristal donde terminó de enfriarse y se solidificó. Parte de esta manteca se uso después en el resto de los ejemplos y otra parte se sometió a la extracción hidroalcohólica.

20 Para realizar esta extracción, se procedió como se describe a continuación. 1 g de sebo de cerdo se fundió a 50-60°C y, posteriormente, se añadieron 5 mL de metanol:agua (65:35, v:v) y 50 µL de HCl 1M. Se agitó vigorosamente con ayuda de un vórtex durante 1 minuto y, a continuación, se separaron las fases por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 min. Se pasó la fase acuosa por una columna tipo C-18(Sep-Pak® Vac 12cc (2g)), y se limpió la
25 columna con 10 mL de agua, 6 mL de hexano y finalmente se eluyó con 8 mL de metilformiato. El eluido se secó bajo corriente de nitrógeno a 55°C y se obtuvo un extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo en estado sólido.

EJEMPLO 2

30 En este ejemplo se desarrolló un experimento que demuestra las propiedades antiinflamatorias del ungüento (sebo de cerdo). Para ello se usó un modelo animal en el que se indujo una inflamación aguda, y tras la cual se testó el producto antiinflamatorio.

Procedimiento experimental. Para llevar a cabo el experimento se utilizaron ratas Sprague
35 de 350-400 gramos de peso. Las ratas se dividieron en dos grupos (n=6): un primer grupo

control que fue sometido a inflamación, y un segundo grupo en el que tras la inflamación fue tratado con el ungüento antiinflamatorio.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico. La inflamación fue inducida mediante una inyección subplantar una de las patas posteriores con zymosan (0,1 ml en suero salino de una concentración 10 mg/ml). El zymosan está formado por fragmentos de pared celular de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y su aplicación genera una inflamación aguda, generando un modelo para el estudio de sustancias antiinflamatorias. La otra pata actuó como control negativo y en ella se inyectó 0,1 ml de suero salino. Mediante este tratamiento se obtiene una inflamación manifiesta en la región plantar con un máximo de edema a la hora de la inyección.

Una hora después de la inyección, a los animales del primer grupo se les extiende una capa de 0,5 g de vaselina que actúa como control, mientras que al segundo grupo se le extiende una capa de 0,5 g del ungüento. Ambos productos se aplican de forma uniforme de manera que quede una capa recubriendo toda la zona inflamada.

Se mide el diámetro de las patas en los tiempos 0 (antes de inducir la inflamación), tiempo 1 hora (antes de poner el ungüento o la vaselina), y tiempo 2, 3 y 4 horas (ver figura 1).

El diámetro de las patas se ve influido por el tratamiento al que es sometido. El diámetro a tiempo 0 es similar en todos los animales. Una hora después de la inyección se observa una respuesta diferencial entre los grupos salino (el diámetro prácticamente no se ve modificado) y los grupos de zymosan (donde el incremento en el diámetro por la inflamación es evidente). A los tiempos 3 y 4 horas se observa como el grupo tratado con el ungüento se recupera de la inflamación de forma significativa más rápidamente que el grupo tratado únicamente con vaselina. El ungüento actúa de forma eficaz reduciendo los síntomas externos de la inflamación.

EJEMPLO 3

Este ejemplo ilustra cómo la aplicación del ungüento en la zona inflamada reduce algunos de los mediadores bioquímicos implicados en el proceso inflamatorio.

El procedimiento experimental es el mismo que el llevado a cabo en el experimento 2. A las 4 horas de haber generado la inflamación los animales son sacrificados por decapitación extrayendo el tejido subplantar que se pesó (ver figura 2) y luego se procesó y recogiendo muestras de sangre.

El tejido fue homogeneizado en tampón fosfato 50 mM, pH 7,0 que contenía 0,5% de hexadeciltrimetilamonio bromide. Los homogenados fueron centrifugados a 8.000 g a 4°C y se recogió el sobrenadante. En el sobrenadante se determinaron las actividades enzimáticas de enzimas antioxidantes (catalasa, y glutatión peroxidasa) y la actividad mieloperoxidasa (enzima que se expresa de forma exclusiva en neutrófilos y es indicativo de inflamación). También se determinaron los niveles de nitrito (indicador indirecto de la producción de óxido nítrico) y niveles de malondialdehído (marcador de daño en lípidos) y de grupos carbonilo en proteínas (marcador de daño en proteínas).

A partir de la sangre se purificaron los neutrófilos. 5 ml de sangre se mezclaron con 5 ml de PBS pH 7,4 y se introdujeron sobre 4 ml de Ficoll. Se centrifugaron las muestras a 900 g durante 30 minutos a 18°C. Se retiró el sobrenadante y se añadieron a los precipitados 10 ml de dextrano al 5%. Se dejaron reposar las muestras 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugaron a 750 g, 10 minutos a 4°C obteniendo un precipitado con los neutrófilos. En los neutrófilos se determinaron las actividades de los enzimas antioxidantes y de la mieloperoxidasa.

Determinaciones enzimáticas. Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2100 a 37°C.

La actividad catalasa fue determinada mediante un método basado en la descomposición del H_2O_2 . Esta descomposición se monitoriza espectrofotométricamente a 240 nm. La concentración final de H_2O_2 era de 10 mM. Se introducía el volumen adecuado de muestra, y se ajustaba con tampón fosfato a 2 ml. La reacción se iniciaba añadiendo 1 ml de H_2O_2 . El volumen final del ensayo era de 3 ml.

La actividad glutatión peroxidasa (GPx) requiere H_2O_2 como sustrato y la reacción se seguía acoplando la reacción enzimática catalizada por la glutatión reductasa. Las concentraciones finales de glutatión reductasa, NADPH y H_2O_2 eran respectivamente de 0,24 U/ml, 200 μ M y 265 μ M. El volumen total de la reacción se ajustaba a 1 ml con tampón fosfato 200 mM con EDTA 1 mM y pH 7. Se seguía la absorbancia a 339 nm, durante 3 minutos.

La actividad mieloperoxidasa (MPO) monitoriza la oxidación del guaiacol. La mezcla de la reacción contenía tampón fosfato pH 7 y 13,5 mM de guaiacol. La reacción se iniciaba con la adición de H_2O_2 300 μ M, monitorizando los cambios a 470 nm.

Determinación de los niveles de nitrito. Los niveles de nitrito fueron determinados como marcador indirecto del óxido nítrico, mediante un método colorimétrico en microplaca de 96 pocillos.

5 Las determinaciones se realizaron en eritrocitos, linfocitos, neutrófilos y en plasma. Las muestras fueron desproteinizadas añadiendo 1,5 volúmenes de acetona, y se dejaron toda la noche a -20°C . Se centrifugaron durante 10 minutos a 15.000 g y 4°C , y se recogieron los sobrenadantes. Para el ensayo, en cada pocillo se introdujeron 100 μl de muestra. Posteriormente se añadieron 50 μl de una disolución de sulfanilamida al 2 % peso/volumen en HCl 5 % y, seguidamente, se añadieron 50 μl de una disolución de N-(1-Naphthyl) etilendiamina al 0,1 % peso/volumen en agua. Se agitaron las placas y se leyeron a 540 nm, tras 30 minutos de incubación. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Para los cálculos se realizó una recta patrón con nitrito sódico.

15 *Determinación de los niveles de MDA.* La concentración de MDA se determinó mediante el uso de un kit colorimétrico (Calbiochem) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Determinación de los grupos carbonilo. Para realizar las determinaciones se precipitaron las muestras con ácido tricloroacético (TCA) al 30%. Los precipitados eran resuspendidos con 500 μl de una solución 10 mM de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), durante 60 minutos a 37°C . Seguidamente las muestras fueron precipitadas con 500 μl de TCA al 20%, centrifugada durante 10 minutos a 1.000 g a 4°C , y el sobrenadante fue descartado. El precipitado obtenido era lavado dos veces con 1 ml de etanol-acetato de etilo (1:1; v/v) para remover el DNPH que permanecía libre, y centrifugado 10 minutos a 1.000 g a 4°C . El precipitado final era resuspendido en 1 ml de guanidina 6 M en tampón fosfato 2 mM y pH 2,3. Las muestras fueron incubadas durante 40 minutos a 37°C . Finalmente, las muestras eran centrifugadas durante 5 minutos a 3.000 g a 4°C para clarificar el sobrenadante. La concentración de grupos carbonilo se determinó a 360 nm, donde el DNPH presenta el máximo de absorción.

30

Todos los resultados obtenidos en el tejido plantar se corrigieron por los niveles de proteína determinados usando un kit comercial (Biorad), mientras que los obtenidos en neutrófilos se expresan corregidos por los niveles de DNA determinados de forma fluorimétrica.

Los resultados relativos al efecto del ungüento sobre la inflamación inducida por zimosan sobre el peso de la pata se muestran en la figura 2.

Tras 4 horas después de inducir la inflamación el peso de la pata presenta valores similares entre los dos grupos de salino. El tratamiento con el ungüento reduce de forma significativa la inflamación como se evidencia con un menor peso de la pata.

En la tabla 1 se muestran los resultados relativos a las actividades enzimáticas, los marcadores de daño oxidativo y los niveles de nitrito en el tejido plantar.

10

Tabla 1. Actividades enzimáticas, marcadores de daño oxidativo y niveles de nitrito en el tejido plantar

	Salino	Salino ungüento	Zimosan	Zimosan ungüento
Actividades enzimáticas				
MPO				
nKat/mg prot.	2,79 ± 0,30	3,02 ± 0,28	21,8 ± 2,4 ^a	17,8 ± 3,0 ^a
GPx				
nKat/mg prot.	0,29 ± 0,02	0,32 ± 0,04	0,38 ± 0,02	0,36 ± 0,06
Catalasa				
mK/mg prot.	11,3 ± 2,8	12,9 ± 1,2	9,17 ± 1,0	10,7 ± 2,2
Daño oxidativo				
MDA				
nmol/g prot	523 ± 79	542 ± 86	648 ± 48	591 ± 79
Grupos carbonilos				
umol/mg prot	15,0 ± 1,1	16,7 ± 1,7	23,9 ± 0,9 ^a	24,2 ± 1,1 ^a
Nitrito				
umol/mg prot	5,81 ± 1,06	6,04 ± 0,54	14,1 ± 1,0 ^a	11,6 ± 0,7 ^b

15 Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05, ANOVA de un factor)

La actividad de la MPO se usa como indicador de inflamación al ser indicativo de la infiltración de neutrófilos en el tejido estudiado, al ser un enzima que se expresa exclusivamente en este tipo celular. El tratamiento con zymosan produce un aumento acusado de la actividad MPO. El ungüento no reduce la actividad MPO respecto al grupo con vaselina, posiblemente porque las señales quimiotácticas para los neutrófilos se liberarían al inicio del proceso de inflamación, antes de añadir el ungüento.

No se observan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en las actividades de los enzimas antioxidantes.

La existencia de daño oxidativo inducido por el zymosan sólo es evidente en el caso de los grupos carbonilo, sin diferencias entre el grupo tratado con el ungüento y el grupo tratado con vaselina.

El nitrito se usa como marcador de la producción de óxido nítrico. El óxido nítrico es un mediador importante en el proceso inflamatorio. El tratamiento con zymosan incrementa de forma significativa los niveles de nitrito, los cuales se ven reducidos por la acción del ungüento. Esta reducción participaría en una más rápida recuperación del proceso inflamatorio.

En la tabla 2 se muestran los resultados de la actividad enzimática en neutrófilos circulantes.

Tabla 2. Actividades enzimáticas en neutrófilos circulantes

	Salino	Salino ungüento	Zymosan	Zymosan ungüento
MPO				
nKat/ug DNA	4,47 ± 0,82 ^a	4,74 ± 0,44 ^a	7,73 ± 1,03 ^b	4,44 ± 0,67 ^a
GPx				
nKat/ug DNA	0,80 ± 0,06	0,79 ± 0,06	0,87 ± 0,0	0,64 ± 0,04
Catalasa				
K/mg DNA	0,15 ± 0,02 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,06 ^b	0,16 ± 0,03 ^a

Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05, ANOVA de un factor)

El grupo tratado con zymosan y vaselina presenta unas actividades MPO y catalasa significativamente más elevadas que el grupo tratado con zymosan y el ungüento. De hecho, el grupo tratado con el ungüento presenta unas actividades similares a los dos grupos tratados con salino. La aplicación del ungüento reduce el grado de activación de los neutrófilos circulantes y, por lo tanto, reduciría el riesgo de sufrir daño oxidativo inducido por la acción de los propios neutrófilos.

EJEMPLO 4

En este ejemplo se desarrolla un experimento que demuestra las propiedades antiinflamatorias del extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo. Para ello se usó un modelo celular (PBMCs, células mononucleares de sangre periférica humana y neutrófilos humanos) en el que se simuló un proceso de inflamación aguda mediante el contacto de las células con un componente de las paredes bacterianas de naturaleza lipopolisacáridica (LPS) como el de *Escherichia coli*. La instauración del proceso inflamatorio se testó mediante la cuantificación de la producción de citoquinas inflamatorias como el TNF- α , y tras la cual se testó el efecto del extracto hidroalcohólico como producto antiinflamatorio.

Las células se aislaron a partir de sangre de la vena antecubital de 8 individuos mediante punción con vacutainers con EDTA como anticoagulante. Se purificaron las fracciones de PBMCs y de neutrófilos utilizando un procedimiento previamente descrito (Boyum 1964; Sureda et al. 2004a). Brevemente, la sangre se introduce en Ficoll en una proporción 1,5:1 y se centrifuga a 900 x g, a 4°C durante 30 minutos. La fracción de PBMCs se extrae cuidadosamente, se conservan el sedimento, que contiene neutrófilos y eritrocitos, y la fase de plasma, descartándose la fase intermedia de Ficoll. La fracción de PBMCs se lava dos veces con tampón fosfato (PBS), pH 7,4, y se centrifuga a 1.000 g, a 4°C durante 10 minutos, consiguiendo finalmente el sedimento de PBMCs.

El sedimento que contiene eritrocitos y neutrófilos, se incuba a 4°C con cloruro de amonio 0,15 M para hemolizar los eritrocitos. La suspensión se centrifuga a 750 g, a 4°C durante 15 minutos y se descarta el sobrenadante. El sedimento de neutrófilos se lava primero con cloruro de amonio 0,15 M y posteriormente con PBS. El último lavado con PBS, tanto del sedimento de PBMCs como del de neutrófilos, se realiza con un volumen de 10 mL. Se reparte equitativamente este volumen en 5 alícuotas de 2 mL en cinco tubos de manera que en cada tubo esté el mismo número de células. Los tubos con las alícuotas de 2mL se centrifugan a 1.000 g a 4°C durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se obtiene un

precipitado de células que son la que se utilizan para evidenciar los efectos inflamatorios del LPS y los efectos antiinflamatorios del extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo.

5 Las PBMCs y los neutrófilos se resuspenden en 2 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, España) solo (control) o con medio de cultivo RPMI-1640 que contiene los diferentes aditivos para realizar la experimentación. Los diferentes cultivos celulares se incuban a 37°C durante 2 horas. Al acabar la incubación se centrifugan a 1.000 g, a 4°C durante 10 minutos, se recogen los sobrenadantes y se guardan a -80°C para el posterior análisis de marcadores de inflamación como el TNF- α .

10

En este experimento se ensayaron los siguientes medios/aditivos repetido 8 veces con células procedentes de 8 donantes en un volumen final de 2 mL:

- Cultivo Control: contiene el medio de cultivo y las células.
- Grupo LPS: contiene el medio de cultivo con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como aditivo y las células (lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0127:B8; Sigma-Aldrich, España).
- 15 - Grupo Extracto: contiene el medio de cultivo con un extracto hidroalcohólico de sebo de cerdo a una concentración de 1 mg/mL y las células.
- Grupo Extracto + LPS: contiene el medio de cultivo con un extracto hidroalcohólico de sebo de cerdo a una concentración de 1 mg/mL y las células al que se le añade LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al cabo de 30 minutos de incubación.
- 20 - Grupo LPS + Extracto: contiene el medio de cultivo con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y las células al que se le añade un extracto hidroalcohólico de sebo de cerdo a una concentración de 1 mg/mL al cabo de 30 minutos de incubación.

En los sobrenadantes de los medios de incubación se determinan los siguientes compuestos: TNF- α , IL-6, IL-8.

25

Los análisis que se realizaron mediante los kits ELISA siguientes:

- TNF- α (Diacclone, Francia, coeficiente de variación intra-ensayo 3,3%, inter-ensayo 9,0%)
- 30 - IL-6 (Diacclone, Francia, coeficiente de variación intra-ensayo 4,4%, inter-ensayo 9,1%)
- IL-8 (RayBio, coeficiente de variación intra-ensayo 10%, inter-ensayo 12%)

Las diferencias entre los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis de la varianza de un factor y un post hoc DMS, $p < 0,05$, utilizando el programa estadístico SPSS, versión 21.0.

35

Los resultados (ver tabla 3) se expresan como tasa de producción de los diferentes parámetros referidos a las células que los producen (cantidad/10³ cel x mL/h).

Tabla 3. Tasa de producción

PBMCs					
	Control	LPS	Extracto	Extracto + LPS	LPS + Extracto
TNF-α					
(pg/10 ³ cel x mL/h)	148 \pm 11a	390 \pm 32b	74,5 \pm 26,7c	106 \pm 8a,c	133 \pm 18a,c
IL-6					
(pg/10 ³ cel x mL/h)	28,1 \pm 3,2a	39,2 \pm 5,4b	2,71 \pm 1,19c	21,1 \pm 5,9a	2,93 \pm 0,57c
IL-8					
(pg/10 ³ cel x mL/h)	857 \pm 82a	1296 \pm 162b	243 \pm 16c	433 \pm 66c	186 \pm 71c
PGE-1					
(pg/10 ³ cel x mL/h)	62,6 \pm 20,5a	41,6 \pm 6,a	1646 \pm 307b	2007 \pm 385b	2005 \pm 394b
Neutrófilos					
IL-6					
(10 ³ cel x mL/h)	5,70 \pm 0,69a	9,66 \pm 2,45b	4,24 \pm 0,56a	3,89 \pm 0,49a	4,91 \pm 0,78a

Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos, p<0,05.

5

La presencia de LPS incrementa la tasa de producción de TNF- α , IL-6, IL-8 por parte de las PBMCs, y la tasa de producción de IL-6 en el caso de los neutrófilos. Se pone de manifiesto que el LPS produce un efecto inflamatorio en PBMCs y en neutrófilos, probablemente a través de la activación y translocación al núcleo del NF κ B que permite la expresión de genes inflamatorios como el TNF- α , IL-6 y IL-8. La adición del extracto hidroalcohólico de sebo de cerdo ya reduce la tasa de producción de TNF- α , IL-6 y IL-8 del cultivo de PBMCs control y reduce mucho más la tasa de producción de estos factores inflamatorios por parte de las PBMCs activadas con LPS, poniendo de manifiesto un potente efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo. El orden en el que se introduce el extracto hidroalcohólico de cerdo, antes o después del LPS parece que no influye en la respuesta antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico. Estos resultados se diferencian así del mecanismo antiinflamatorio que presentan algunos productos de oxidación de fosfolípidos

naturales, que tan sólo actúan si previamente a la adición del estímulo inflamatorio ya están presentes en el medio.

Así mismo, el extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo incrementa significativamente la producción de PGE-1 por parte de las PBMCs sin que la presencia de LPS modifique la tasa de producción. Se ha indicado que la PGE-1 tiene efectos antiinflamatorios. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que o bien el extracto hidroalcohólico presenta unos niveles elevados de PGE1 o bien de un precursor de su síntesis como el ácido graso 9,12-octadecadienoico.

10

EJEMPLO 5

Este ejemplo ilustra la diferente composición del sebo de cerdo y del extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo respecto de la composición de la materia de partida para la elaboración del sebo de cerdo siguiendo el procedimiento descrito en la presente invención. Los componentes con actividad antiinflamatoria están presentes en el sebo de cerdo ya tratado y en el extracto hidroalcohólico, pero no lo están en la materia de partida de la elaboración del sebo o están en concentraciones inferiores, aunque algunos componentes precursores de compuestos antiinflamatorios están presentes en menor concentración en la materia de partida.

20

Para determinar la composición del sebo de cerdo de la panceta de partida se realizó una extracción del contenido total de lípidos con disolventes orgánicos, se derivatizaron por trans-esterificación/esterificación a los metil ésteres de los ácidos grasos, se separaron y cuantificaron estos metil ésteres y otros productos no metilados por cromatografía de gases. Así mismo, se cuantificó por procedimientos inmunológicos el contenido de resolvina en el extracto orgánico seco del sebo y de la panceta. También se identificaron y cuantificaron los componentes del extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo y de la panceta. Los componentes del extracto hidroalcohólico se trans-esterificaron/esterificaron y se separaron por cromatografía de gases acoplada a un espectrofotómetro de masas. La identificación de los diferentes picos cromatográficos se realiza por comparación con los espectros de masas de sustancias puras y por el tiempo de retención de los picos cromatográficos. En algunos casos se utilizaron patrones de los productos puros para confirmar su identificación.

30

Los procedimientos seguidos se resumen a continuación. El contenido lipídico del sebo y de la panceta previamente triturada (5 g) se extrae siguiendo una modificación del método de

35

Folch (Folch et al., 1957) mediante cloroformo/metanol (2:1, v:v) con 0,01% hidroxibutilanisol (BHA) como antioxidante y 2 μL de ácido n-heptadecanoico (15 mM) como patrón interno. La fase orgánica resultante se evapora bajo corriente de nitrógeno a 55°C. El residuo seco se disuelve en 100 μL de hexano y, posteriormente, se añaden 25 μL de reactivo de derivatización (Meth-Prep™ II) dejando reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una alícuota de 1 μL se inyecta al cromatógrafo de gases usando helio como fase móvil con un flujo de 2,17 mL/min, medido a 150°C en cabeza de columna. El cromatógrafo de gases es un Agilent modelo 5890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) con un detector de ionización de llama (FID) y una columna Supelcowax® 10 Capillary GC column, 30 m x 0,53 mm, df 0,50 μm (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU). La rampa de temperatura empieza a 150°C con un gradiente de temperatura de 4°C/min hasta 260°C y después una temperatura isoterma mantenida durante 15 minutos. El inyector se encuentra a 280°C y el FID a 300°C.

El residuo seco de los extractos hidoroalcohólicos del sebo de cerdo o de la panceta de cerdo obtenidos según el procedimiento descrito precedente de 10g se disuelve en 100 μL de reactivo de derivatización (Meth-Prep™ II) dejando reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una alícuota de 5 μL se inyecta al cromatógrafo de gases con helio como fase móvil con un flujo de 0,5 mL/min, medido a 150°C en cabeza de columna. El cromatógrafo de gases Agilent modelo 6890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) está acoplado a un detector de masas de impacto electrónico Agilent modelo 5975 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU). La columna cromatográfica es una columna Supelcowax® 10 Capillary GC column, 30 m x 0,53 mm, df 0,50 μm (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU). La rampa de temperatura empieza a 150°C con un gradiente de temperatura de 4°C/min hasta 260 °C y después una temperatura isoterma mantenida durante 15 minutos. El inyector se encuentra a 280°C.

La determinación de la resolvina D1 se realiza del extracto hidroalcohólico de 1 g de sebo cerdo o de panceta, mediante el procedimiento descrito anteriormente, utilizando un kit de ELISA para la determinación de resolvina D1 (Cayman, EEUU, coeficient of variation intra-assay 11,4%), siguiendo las instrucciones y con las interferencias que allí se describen.

Los resultados referidos a la composición del sebo de cerdo y de la panceta de cerdo, teniendo en cuenta tanto los componentes determinados en el extracto orgánico como los determinados en el extracto hidroalcohólico como los determinados con el análisis inmunológico se detallan a continuación:

Tabla 4. Composición del sebo tratado y de la panceta de partida

Molécula (TR, min)	Sebo (%)	Panceta (%)
C12:0 (6,213)	0,937 ± 0,064	0,674 ± 0,119
C14:0 (9,826)	0,380 ± 0,065	0,465 ± 0,210
C16:0 (13,785)	10,2 ± 1,27	4,30 ± 0,09
C16:1 (14,390)	3,18 ± 0,09	2,70 ± 0,94
C18:0 (18,048)	13,9 ± 1,1	5,43 ± 1,19
C18:1n9 (18,540)	15,6 ± 2,5	8,84 ± 0,51
C18:2n6 (19,577)	3,99 ± 0,429	4,09 ± 0,47
C18:3n6 (20,254)	0,784 ± 0,158	0,283 ± 0,070
C18:3n3 (20,982)	1,67 ± 0,34	1,61 ± 0,08
C20:0 (22,306)	0,372 ± 0,044	0,204 ± 0,057
C20:1n9 (22,789)	2,81 ± 0,24	10,4 ± 3,1
C20:2 (23,826)	0,784 ± 0,185	0,920 ± 0,153
C20:3 (24,409)	0,150 ± 0,033	0,385 ± 0,071
C20:4n6 (24,942)	4,92 ± 2,26	2,18 ± 0,63
C20:5n3 (25,212)	0,414 ± 0,128	0,211 ± 0,017
C22:0 (26,398)	2,78 ± 0,79	6,38 ± 0,31
C22:1n9 (26,897)	0,634 ± 0,145	1,39 ± 0,09
C22:2 (27,918)	1,97 ± 0,27	0,565 ± 0,028
C24:0 (30,603)	4,75 ± 1,00	6,24 ± 0,31
C24:1n9 (31,244)	2,45 ± 0,46	4,40 ± 0,57
C22:6n3 (31,437)	6,80 ± 1,63	11,4 ± 0,2
SFA	33,3 ± 0,8	23,7 ± 1,3
MUFA	24,6 ± 2,5	27,7 ± 1,5
PUFA	21,5 ± 3,1	21,7 ± 1,5
5-Dodecanolida	0,00543 ± 0,00018	ND
Hexadecanamida	0,00129 ± 0,00025	ND
Octadecenamida	0,00607 ± 0,00060	ND
Resolvina D1 (pg/g de sebo)	2360 ± 234	509 ± 20
H ₂ O (%)	0,657 ± 0,078	
Área identificada	79,4 ± 2,5	73,04 ± 1,5
Área no identificada	20,6 ± 2,1	26,96 ± 1,05

ND no detectado. C20:3 = C20:3n6 + C20:3n3. SFA ácidos grasos saturados (saturated fatty acids), MUFA ácidos grasos monoinsaturados (monounsaturated fatty acids), PUFA ácidos grasos poliinsaturados (polyunsaturated fatty acids).

El perfil de ácidos grasos del sebo de cerdo y de la panceta de cerdo es diferente dando a entender los efectos de la elaboración del sebo sobre la composición de ácidos grasos. Es destacable que el proceso de elaboración del sebo produce nuevos componentes como 5-dodecanolida, hexadecanamida y octadecenamida, así como la liberación de ácidos grasos como el ácido hexadecanoico, ácido 9-octadecenoico o el ácido 6-Octadecenoico, el ácido 9,12-octadecadienoico, el ácido octadecanoico, el ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico, el ácido 7-hexadecenoico, el ácido 11,14-octadecadienoico que aparecen en la composición del extracto hidroalcohólico y que en la composición del sebo y panceta de cerdo están incluidos en los respectivos valores globales de cada uno de estos ácidos grasos.

La composición del extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo se indica en la siguiente tabla 5. En el extracto hidroalcohólico de la panceta no se detectaron estos componentes a excepción de la resolvina D1 que se detectó tanto en el extracto hidroalcohólico del sebo (2360 ± 234 pg/g sebo) como en el de la panceta (509 ± 20 pg/g panceta).

Tabla 5: CG-MASAS COMPOSICIÓN EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DEL SEBO DE CERDO

Molécula (Certeza, %)	Fórmula molecular	TR (min)	Porcentaje (%)	Min-Max (%)
Hexadecanoico, metil éster (93%)	$C_{17}H_{34}O_2$	4,788	$0,603 \pm 0,096$	0,505 – 0,701
9-Octadecenoico, metil éster (99%)	$C_{19}H_{36}O_2$	5,632	$61,6 \pm 2,2$	59,4 – 63,7
6-Octadecenoico, metil éster (99%)	$C_{19}H_{34}O_2$	6,367	$13,3 \pm 0,8$	12,5 – 14,0
9,12-Octadecadienoico, metil éster (99%)	$C_{19}H_{34}O_2$	6,367	$13,3 \pm 0,8$	12,5 – 14,0
Octadecanoico, metil éster (85%)	$C_{19}H_{38}O_2$	7,107	$0,307 \pm 0,166$	0,136 – 0,478
5,8,11,14-eicosatetraenoico, etil éster (90%)	$C_{22}H_{36}O_2$	10,929	$5,77 \pm 0,42$	5,32 – 6,21
5-Dodecanolida (81%)	$C_{12}H_{22}O_2$	12,935	$4,49 \pm 0,15$	4,34 – 4,63
7-hexadecenoico, metil éster (89%)	$C_{17}H_{32}O_2$	13,176	$2,08 \pm 0,72$	1,33 – 2,83
11,14-octadecadienoico, metil éster (93%)	$C_{19}H_{34}O_2$	16,956	$5,84 \pm 0,15$	5,67 – 6,00

Hexadecanamida (92%)	$C_{16}H_{33}NO$	18,513	$1,07 \pm 0,21$	0,890 – 1,28
Octadecenamida (82%)	$C_{18}H_{35}NO$	22,261	$5,02 \pm 0,50$	3,19 – 6,84
Resolvina D1 ($\mu\text{g/g}$ de extracto)	$C_{22}H_{32}O_5$		$2,86 \pm 0,28$	1,93-3,02

La identificación de los componentes del extracto hidroalcohólico se realizó por espectrometría de masas, teniendo en cuenta el tiempo de retención del compuesto. En la tabla se indican los derivados metilados de los compuestos del extracto hidroalcohólico que son los que se separan por cromatografía de gases. Así mismo, hay compuestos presentes que no se han metilado y que se separan en su forma nativa del extracto hidroalcohólico. Entre paréntesis se indica el porcentaje de similitud del espectro de masas del pico cromatográfico correspondiente a cada tiempo de retención con el del compuesto puro de referencia. En el caso de la 5-dodecanolida y de la oleamida, se utilizaron compuestos patrón para comprobar su elución en el mismo tiempo de retención y su espectro de masas. Los resultados de los espectros de masas se muestran a continuación: los picos cromatográficos en los tiempos de retención de 12,935 minutos y 22,261 minutos separados del extracto hidroalcohólico tienen un espectro de masas que incluye los espectros de masas correspondientes a la 5-dodecanolida y a la oleamida; a su vez, estos productos puros tienen los mismos tiempos de retención.

Algunos de estos componentes de los extractos hidroalcohólicos del sebo de cerdo tienen actividad antiinflamatoria.

20 EJEMPLO 6

En este ejemplo se desarrolla un experimento que demuestra las propiedades antiinflamatorias de algunos de los componentes del extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo. Se utilizaron componentes puros del extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo obtenidos de casas comerciales de productos químicos. Se usó un modelo celular (neutrófilos humanos) en el que se simuló un proceso de inflamación aguda mediante el contacto de las células con un componente de las paredes bacterianas de naturaleza lipopolisacáridica (LPS) como el de *Escherichia coli*. La instauración del proceso inflamatorio se testó mediante la cuantificación de la liberación de catalasa y de mieloperoxidasa al medio de cultivo como indicadores de la desgranulación de neutrófilos activados por LPS. Se testó el efecto de 5-dodecanolida, resolvina D1, octadecenamida y el extracto

hidroalcohólico del sebo de cerdo. Los productos puros proceden de resolvina D1, oleamida y 5-dodecanolida proceden de Quimigen S.L., España. Los neutrófilos se obtuvieron a partir de sangre venosa de seis donantes, siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 4. El extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito en esta patente. Las actividades enzimáticas catalasa y mieloperoxidasa se determinaron siguiendo los procedimientos descritos en el ejemplo 2 en los sobrenadantes de la centrifugación de los cultivos de neutrófilos incubados según las condiciones descritas en el ejemplo 3. Las concentraciones de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico ensayadas corresponden con las que proporciona el extracto hidroalcohólico en el medio de cultivo.

Los neutrófilos de cada participante se distribuyeron entre los siguientes tipos de cultivos:

- Grupo Control: medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, España).
- Grupo LPS: medio de cultivo con LPS de *Escherichia coli* 0127:B8 (Sigma-Aldrich, España) a una concentración final de 1 µg/mL.
- Grupo LPS con resolvina: medio de cultivo con LPS (1 µg/mL) y Resolvina D1 (1 ng/mL).
- Grupo LPS con oleamida: medio de cultivo con LPS (1 µg/mL) y Oleamida (0,06 mg/mL).
- Grupo LPS con 5-dodecanolida: medio de cultivo con LPS (1 µg/mL) y 5-dodecanolida (0,04 mg/mL).
- Grupo LPS con Extracto hidroalcohólico: medio de cultivo con LPS 1 µg/mL y extracto hidroalcohólico (1 mg/mL).

Tabla 6: Actividad catalasa (CAT) y mieloperoxidasa (MPO) en los sobrenadantes de las incubaciones de neutrófilos en presencia de diversos componentes del extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo

	CAT (K/10 ⁶ neutrófilos)	CAT (%)	MPO (nKat/10 ⁶ neutrófilos)	MPO (%)
Control	53.7 ± 7.2 _{a,c}	100 ± 13.3 _{a,c}	69.1 ± 39.8 _a	100 ± 57.6 _a
LPS	116 ± 19 _b	215 ± 35.7 _b	177 ± 62.0 _b	197 ± 86.3 _b
LPS+ Resolvina	75.2 ± 2.2 _{b,c}	139 ± 4.04 _{b,c}	7.38 ± 2.03 _c	10.7 ± 2.93 _c
LPS + Oleamida	34.3 ± 13.8 _{a,c}	63.7 ± 25.7 _{a,c}	10.9 ± 3.01 _c	15.8 ± 4.35 _c
LPS + 5-Dodecanolida	51.3 ± 14.2 _{a,c}	95.5 ± 26.5 _{a,c}	11.7 ± 1.95 _c	16.9 ± 2.81 _c
LPS + Extracto sebo	20.8 ± 7.4 _a	38.7 ± 13.8 _a	8.67 ± 1.92 _c	12.5 ± 2.77 _c

Análisis estadístico: ANOVA de un factor, posthoc DMS, p<0,05

La presencia del LPS induce una respuesta inflamatoria en los neutrófilos propiciando la desgranulación e incremento significativo de la actividad catalasa y mieloperoxidasa en el medio extracelular. El extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo reduce significativamente el proceso inflamatorio inducido por el LPS, a valores incluso inferiores que el propio control sin activar con LPS. La adición de resolvina D1, de 5-dodecanolida y de oleamida reduce al nivel control la actividad catalasa extracelular y la actividad mieloperoxidasa extracelular al nivel del extracto hidroalcohólico del sebo de los cultivos de neutrófilos activados con LPS.

10 EJEMPLO 7

En este ejemplo se desarrolla un experimento que demuestra las propiedades antiinflamatorias de algunos de los componentes del extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo. Se utiliza uno de los componentes del extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo, la 5-dodecanolida procedente de Quimigen S. L., España. Se usó un modelo celular (neutrófilos humanos) en el que se simuló un proceso de inflamación aguda mediante el contacto de las células con un componente de las paredes bacterianas de naturaleza lipopolisacáridica (LPS) como el de *Escherichia coli*. La instauración del proceso inflamatorio se testó mediante la cuantificación de la producción de la citoquina pro-inflamatoria, el factor necrótico tumoral alfa (TNF- α), y tras la cual se testó el efecto de 5-dodecanolida, uno de los componentes del extracto hidroalcohólico del sebo de cerdo, a diferentes concentraciones.

Los neutrófilos se obtuvieron a partir de sangre venosa de nueve donantes, siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 4. Se determina los niveles de TNF- α en los sobrenadantes de la centrifugación de los cultivos de neutrófilos incubados según los procedimientos y condiciones descritas en el ejemplo 3.

5

Tabla 7: Niveles de TNF- α en los sobrenadantes de las incubaciones de neutrófilos en presencia de LPS y de diferentes concentraciones de 5-dodecanolida

	TNF- α (pg /10 ⁶ neutrófilos·mL/h)
Control	15,4 \pm 3,05 a,c
LPS	79,1 \pm 11,0 b
LPS + 5-dodecanolida (0,1 mg/mL)	9,15 \pm 1,53 a
LPS + 5-dodecanolida (0,06 mg/mL)	13,5 \pm 2,15 a,c
LPS + 5-dodecanolida (0,01 mg/mL)	25,9 \pm 3,78 c
5-dodecanolida (0,1 mg/mL)	7,08 \pm 0,73 a
5-dodecanolida (0,06 mg/mL)	6,87 \pm 0,75 a
5-dodecanolida (0,01 mg/mL)	8,2 \pm 1,60 a

Análisis estadístico: ANOVA 1 factor, posthoc DMS, p<0,05

El LPS desencadena una respuesta inflamatoria activando significativamente la síntesis de TNF- α que incrementa unas cinco veces. La 5-dodecanolida no altera la producción de TNF- α control; sin embargo, elimina totalmente el efecto pro-inflamatorio del LPS de una manera dependiente de la concentración de 5-Dodecanolida. El efecto antiinflamatorio de la 5-dodecanolida, medido como la menor capacidad de la producción de TNF- α por parte de neutrófilos activados con LPS, es unas 3 veces mayor si la concentración de 5-dodecanolida es de 0,1mg/mL que si es 0,01mg/mL, aunque todas las concentraciones ensayadas reducen a nivel control la tasa de producción de TNF- α por parte de los neutrófilos activados con LPS.

15

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende 5-dodecanolida como principio activo y uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
5
2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 que adicionalmente comprende uno o más de los compuestos seleccionados entre octadecenamida, resolvina D1, ácido hexadecanoico, ácido 9-octadecenoico, ácido 6-octadecenoico, ácido 9,12-octadecadienoico, ácido octadecanoico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico, ácido 7-
10 hexadecenoico, ácido 11,14-octadecadienoico, hexadecanamida.
3. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el 5-dodecanolida se encuentra en un porcentaje de entre 2-6% del total del peso de la composición.
15
4. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende en porcentaje en peso con respecto al total de la composición:
20
 - a) 4,34-4,63% de 5-dodecanolida
 - b) 0,05-0,7% de ácido hexadecanoico
 - c) 59,4-63,7% de ácido 9-octadecenoico o ácido 6-octadecenoico
 - d) 12,5-14% de ácido 9,12-octadecadienoico
 - e) 0,13-0,47% de ácido octadecanoico
 - f) 5,32-6,21% de ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico
 - 25 g) 1,33-2,83% de ácido 7-hexadecenoico
 - h) 5,67-6,00% de ácido 11,14-octadecadienoico
 - i) 0,89-1,28% de hexadecanamida
 - j) 3,19-6,84% de octadecenamida
 - k) 1,93-3,02% de resolvina D1.
30
5. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en forma de ungüento para aplicación tópica.
6. Procedimiento para obtener una composición de acuerdo con cualquiera de las
35 reivindicaciones anteriores que comprende:
 - a) Extracción de la manteca de cerdo

- b) Trituración de la manteca
- c) Cocción de la manteca triturada
- d) Separación por tamizado de la manteca líquida de los chicharrones
- e) Opcionalmente, extracción hidroalcohólica de la manteca líquida

5

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 donde la manteca se extrae a partir de la panceta y del tejido adiposo del epiplón.

10 8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 donde la trituración se hace por medios mecánicos hasta alcanzar una masa homogénea.

9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 donde la cocción implica llevar a ebullición de la grasas de la manteca durante un tiempo de entre 50 a 90 minutos.

15

10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 donde la extracción hidroalcohólica se hace en una solución alcohol:agua 65:35 (v:v), preferiblemente metanol:agua y opcionalmente en presencia de un ácido, preferiblemente HCl.

20 11. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de la inflamación.

12. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 11 donde la inflamación tratada es la inflamación asociada a enfermedades articulares como la artritis o artrosis.

25

13. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 11 donde la inflamación tratada es la inflamación asociada a enfermedades infecciosas como la mastitis o el acné.

30 14. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 11 donde el tratamiento de la inflamación se hace por vía tópica.

15. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 13 donde el tratamiento por vía tópica permite tratar inflamaciones a nivel superficial como traumatismos, esguinces, contusiones, tendinitis, la mastitis o el acné.

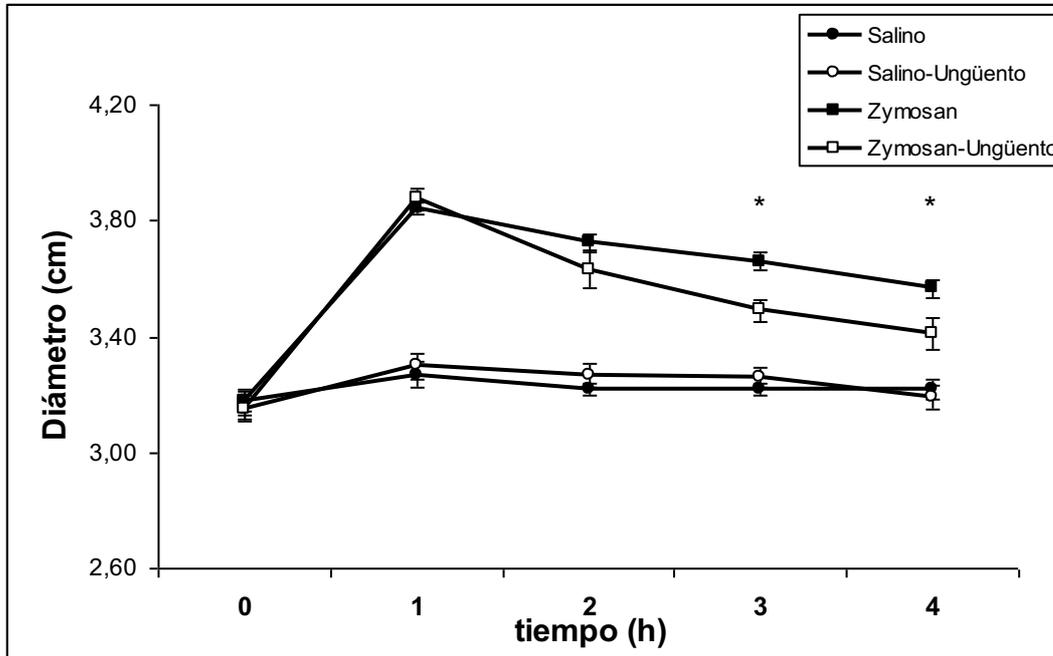


Fig. 1

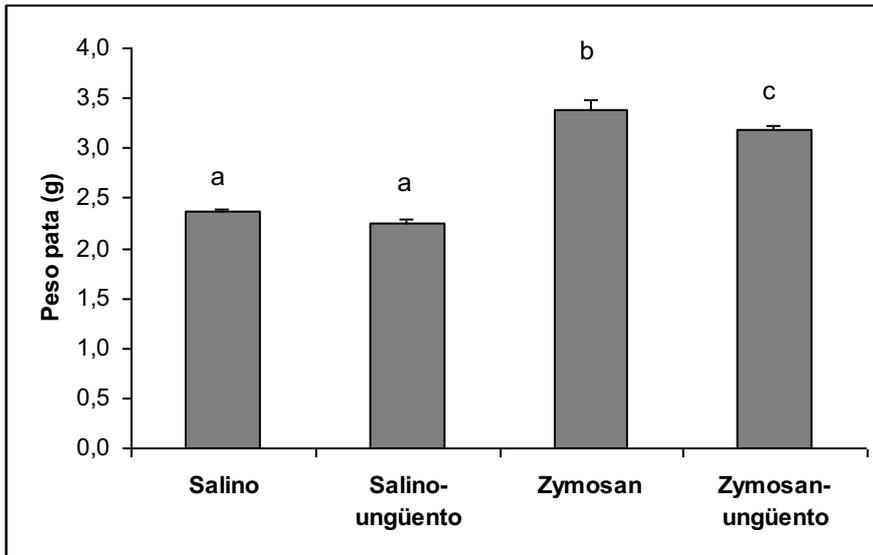


Fig.2



- ②¹ N.º solicitud: 201630015
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 12.01.2016
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5527693 A (CARDILLO ROSANNA et al.) 18/06/1996, reivindicaciones	1-15
A	US 5128261 A (MARIA DE LAAT WILHELMUS T A et al.) 07/07/1992, reivindicaciones	1-15
A	WO 9409646 A1 (UNILEVER PLC et al.) 11/05/1994, ejemplo 1, reivindicaciones	1-15
A	ES 2087036 A1 (CABALLERO AGUERRI IGNACIO) 01/07/1996, reivindicaciones	1-15
A	US 2014377370 A1 (ZURAK ALAN) 25/12/2014,	1-15
A	WO 2009077635 A2 (MENARGUES CEREZO MARCELINO et al.) 25/06/2009, reivindicaciones	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 01.02.2017	Examinador H. Aylagas Cancio	Página 1/4
---	--	----------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08G63/08 (2006.01)

A61K31/366 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08G, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.02.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 5527693 A (CARDILLO ROSANNA et al.)	18.06.1996
D02	US 5128261 A (MARIA DE LAAT WILHELMUS T A et al.)	07.07.1992
D03	WO 9409646 A1 (UNILEVER PLC et al.)	11.05.1994
D04	ES 2087036 A1 (CABALLERO AGUERRI IGNACIO)	01.07.1996
D05	US 2014377370 A1 (ZURAK ALAN)	25.12.2014
D06	WO 2009077635 A2 (MENARGUES CEREZO MARCELINO et al.)	25.06.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende 5-dodecanolida y otros compuestos tales como resolvina D1, ácidos octadecenoico, octadecanoico, hexadecenoico, etc. Se reivindica el procedimiento de obtención de la decanolida a partir de la manteca de cerdo y el uso de la composición que la contiene en el tratamiento de la inflamación.

Los documentos citados D1 y D2 se refieren a diferentes procedimientos de obtención de la dodecanolida y decanolida, por biohidrogenación o por reducción biocatalítica.

El documento D3 se refiere a productos alimenticios saborizantes que llevan en su composición 5-decanolida y 5-dodecanolida (ver ejemplo 1 y reivindicaciones)

Los documentos D4, D5 y D6 se refieren todos ellos a la utilización de la manteca de cerdo como antiinflamatorio pero sin que en ellos se hable del compuesto al que es debida esta acción antiinflamatoria.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados, si bien en los documentos D1-D3 se observa que la dodecanolida es conocida en el estado de la técnica, no se cita en ninguno de ellos el uso como antiinflamatorio al que se refiere la presente solicitud.

En consecuencia, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-15 de la presente solicitud tiene novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.