

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 153**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/28** (2006.01)

**A61K 8/97** (2007.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2011 E 11425125 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2520306**

54 Título: **Procedimiento para preparar un extracto de inflorescencias de Calendula Officinalis por medio de extracción con dióxido de carbono supercrítico y composiciones que contienen dicho extracto**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.02.2018**

73 Titular/es:

**UNIFARCO S.P.A. (100.0%)**  
**Via Cal Longa 62**  
**32035 Santa Giustina (BL), IT**

72 Inventor/es:

**BARATTO, GIOVANNI y**  
**RIVA, ERNESTO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 656 153 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para preparar un extracto de inflorescencias de *Calendula Officinalis* por medio de extracción con dióxido de carbono supercrítico y composiciones que contienen dicho extracto

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un extracto de *Calendula Officinalis* y composiciones cosméticas y farmacéuticas que lo contienen.

**Antecedentes de la invención**

10 La *Calendula Officinalis* es una planta que pertenece a la familia Asteraceae, conocida por sus numerosas propiedades fitoterapéuticas, principalmente por sus propiedades antiinflamatorias, lenitivas y cicatrizantes. El fármaco está constituido por las flores y por las sumidades floridas, a partir de las cuales se obtienen las tinturas y extractos que se usan normalmente para preparar formulaciones tópicas. Entre los principios activos contenidos en el fármaco, llevan a cabo una función importante los ésteres de alcoholes triterpénicos tales como calenduladiol, arnidiol y faradiol.

15 Los extractos de *Calendula Officinalis* obtenidos por medios de extracción con disolvente orgánico, en general tienen un contenido bajo no estandarizado de dichos ésteres y también contienen otras sustancias innecesarias para obtener el efecto deseado; por lo tanto, se deben usar cantidades considerables de extracto para la preparación de los productos acabados, con evidentes dificultades desde el punto de vista de la formulación. Además, es necesario asegurar que no hay residuos de disolventes en los productos acabados, con el fin de evitar reacciones alérgicas; finalmente, siempre es preferible evitar el uso de disolventes orgánicos para reducir el impacto ambiental.

20 Se sabe que los extractos de plantas se pueden preparar por medio de extracción con dióxido de carbono en fase supercrítica, que en general permite mantener los principios activos contenidos en el material de la planta íntegros, en particular los más inestables; este método también se usó para la preparación de extractos de *Calendula Officinalis*. Por ejemplo, Hamburger M. et al, *Fitoterapia* 74, 328-338 (2003) describe la purificación de ésteres de triterpenoides de caléndula mediante una combinación de extracción con dióxido de carbono en fase supercrítica y cromatografía en columna en fase normal y fase inversa; la extracción con dióxido de carbono en fase supercrítica se lleva a cabo a la presión de 500 bar y a la temperatura de 50°C, con una velocidad de flujo de dióxido de carbono de 35 kh.h<sup>-1</sup>. Al final del procedimiento, se obtiene un extracto que contiene la mezcla de triterpenoides en cantidades de 18-20%, en donde la cantidad de éster de faradiol obtenida es aproximadamente 85% de los ésteres de faradiol totales; no obstante, el extracto se debe someter a etapas de purificación adicionales con el fin de eliminar los componentes no deseados, en particular los carotenoides.

35 Baumann D. et al. *Phytochemicals analysis* 15, 226-230 (2004), describen la extracción de forma analítica en una escala piloto de flores de caléndula mediante dióxido de carbono en fase supercrítica, a una presión variable entre 300 y 800 bar y a la temperatura de 50°C. Los autores observan que se puede obtener una mejora cualitativa y cuantitativa en el miristato de faradiol solo aumentando la presión y añadiendo una pequeña cantidad de un modificador de extracción, es decir, etanol al 0,5%.

40 Danielski L. et al., *Chemical Engineering and Processing* 46, 99-106 (2007), describen la preparación de una oleorresina a partir de flores de caléndula procedentes de Brasil mediante la extracción con dióxido de carbono en fase supercrítica a una temperatura comprendida entre 20,0 y 40,0°C y una presión comprendida entre 120,0 y 200,0 bar. Debido al origen de la planta y las condiciones de extracción, los ésteres triterpenoides, en particular ésteres de faradiol, no están presentes en la oleorresina.

45 Della Loggia R et al., "The role of terpenoids in the topical anti-inflammatory activity calendula officinalis flowers" *Planta Medica*, Theme Verlag DE vol. 60 1.0 1. 1994, páginas 515-520) describe un extracto de CO<sub>2</sub> que contiene una mezcla del éster triterpénico (ésteres de calenduladiol, arnidiol y faradiol) en cantidades de aproximadamente 25%, en donde los ésteres de faradiol representan en total 75% de la mezcla de triterpenos anterior, en donde los compuestos más activos, es decir, los ésteres de faradiol están presentes en la cantidad de 19%.

50 Fuchs et al.: "Protective effects of different marigold extracts of different marigold (*Calendula Officinalis* L.) and rosemary cream preparations against sodium laurylsulfate induced irritant contact dermatitis" *Skin Pharmacology and Physiology*, vol.18, no.4, 2005, páginas 195-200) describen que los extractos de CO<sub>2</sub> teñidos y no teñidos de caléndula son eficaces en el tratamiento de la dermatitis de contacto irritante. Sin embargo, en esta referencia no se dice nada sobre la composición de dichos extractos de CO<sub>2</sub> y además no se dice nada sobre el procedimiento para preparar estos extractos.

55 Reznicek et al.: "Quantitative determination of the faradiol esters in marigold flowers and extracts" *Scientia Pharmaceutica* 20030630AT, vol.71, no.2 30 Junio 2003, páginas 121-128, describe un extracto que contiene ésteres de faradiol en cantidades de 29,82%, y los mismos autores en "Analytik der Faradiolmonoester in Ringelblumenblueten, Extracten und Salben" Zeitschrift fuer Phytotherapie, Hippocrates Verlag in MVS Medizineverlage, DE, vol.21, No. 3, 1 de enero 2000, páginas 152-153, describen que los ésteres de faradiol

alcanzan 20-30% en extractos de CO<sub>2</sub>.

El documento WO03/037833 describe un procedimiento para la extracción con CO<sub>2</sub> a partir de harinas de pétalos de caléndula, se dirige a la extracción de un compuesto químico, en concreto el diéster de luteína.

### Descripción de la invención

- 5 Ahora se ha encontrado que sometiendo las flores de *Calendula officinalis* a extracción con dióxido de carbono en fase supercrítica en condiciones específicas, se pueden obtener productos con diferente consistencia. Estos productos, cuando se mezclan entre sí, forman un extracto blando que tiene un contenido normalizado y equilibrado de ésteres de triterpenos, y se ha encontrado que este extracto se puede usar convenientemente para preparar composiciones lipófilas tópicas que tienen acción lenitiva, protectora y antienrojecimiento.
- 10 La presente invención se refiere por lo tanto a:
- un procedimiento para extraer una mezcla de éteres de triterpenos a partir de sumidades de flores de *Calendula officinalis* según la reivindicación 1-2, un procedimiento para preparar extractos totales según las reivindicaciones 3-4,
  - los extractos totales según las reivindicaciones 5 y 6,
  - 15 - el uso como un medicamento del extracto total, según la reivindicación 7, en donde dicho medicamento está en forma de una formulación tópica, que contiene dicho extracto total en una cantidad comprendida entre 0,01 y 6% en peso con respecto al peso total de dicha formulación,
  - formulación farmacéutica o cosmética tópica que contiene este extracto total en una cantidad comprendida entre 0,01 y 6% en peso con respecto al peso total de dicha formulación según la reivindicación 8,
  - 20 - el uso del extracto total de sumidades floridas según la reivindicación 6, en formulaciones cosméticas, en donde dicho extracto está contenido en dicha formulación cosmética tópica en una cantidad comprendida entre 0,01 y 6% en peso con respecto al peso total de dicha formulación.

El procedimiento que es el objeto de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar sumidades floridas de *Calendula officinalis*;
- 25 b) someter dichas sumidades floridas a extracción con dióxido de carbono en fase supercrítica a una temperatura comprendida entre 60 y 70°C y a una presión comprendida entre 600 y 700 bar, durante un periodo de tiempo comprendido entre 200 y 250 min, preferiblemente durante 230 min;
- c) disminuir la presión a 200-300 bar y recoger el extracto así obtenido (en lo sucesivo definido "extracto A");
- d) disminuir más la presión a 60-70 bar y recoger el extracto así obtenido (en lo sucesivo definido "extracto B").
- 30 Con más detalle, las sumidades floridas secas de *Calendula officinalis* con un contenido de humedad residual entre 3 y 5% en p/p se trituran y tamizan adecuadamente; la trituración se puede llevar a cabo por medios y técnicas conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante un molino de martillos. La fracción que tiene un tamaño de granos comprendido entre 2 y 5 mm se pone en el recipiente de extracción y se trata en las condiciones indicadas antes. Preferiblemente, se usan flores de origen europeo.

- 35 El procedimiento de extracción según la invención se puede llevar a cabo con instrumentos convencionales; no obstante, la extracción de la planta comprenderá, además de una primera cámara de extracción en la que se lleva a cabo la etapa b), también dos intercambiadores de calor y dos cámaras de recolección corriente abajo de la cámara de extracción para la separación de los extractos obtenidos en las etapas c) y d). Un extracto de planta que es particularmente adecuado para llevar a cabo el procedimiento se describe en la solicitud de patente DE 10 2009 023 549 A1.
- 40

Los extractos A y B obtenidos con el procedimiento según la invención se mezclan con una relación en peso comprendida entre 0,5:9,5 (A:B) y 3:7 (A:B), preferiblemente en una relación de 1:9 (A:B); la mezcla resultante definida en lo sucesivo como el "extracto total", se puede usar convenientemente para preparar formulaciones para uso farmacéutico o cosmético que tienen acción lenitiva, protectora y antienrojecimiento.

- 45 En los extractos A y B obtenidos con el procedimiento según la invención, el contenido de éster de los alcoholes triterpénicos principales, es decir, calenduladiol, arnidiol y faradiol, en particular los ésteres palmítico, láurico y mirístico, está en el intervalo de 2 a 8% en peso; por lo tanto, estos extractos se considera que están enriquecidos en ésteres triterpénicos. Por consiguiente, el extracto total obtenido a partir de su mezcla contiene al menos 3% en peso de ésteres triterpénicos, expresado como una mezcla de miristatos, lauratos y palmitatos de calenduladiol, arnidiol y faradiol; los ésteres de faradiol representan al menos 35% en peso de los ésteres triterpénicos totales. En
- 50 virtud de la cantidad significativa de ésteres triterpénicos, las formulaciones tópicas que contienen el extracto

aseguran una eficacia que es igual o mayor que la de los productos conocidos hasta ahora, y son muy tolerables debido a la reducción de los componentes con acción indeseada.

5 Por lo tanto, también son objeto de la presente invención formulaciones tópicas que contienen el extracto total constituido por los extractos A y B en una relación en peso en el intervalo de 0,5:9,5 (A:B) a 3:7 (A:B), preferiblemente 1:9 (A:B), en una mezcla con excipientes y/o vehículos adecuados y posibles ingredientes activos adicionales. El extracto total está contenido en una cantidad comprendida entre 0,01% y 6% en peso con respecto al peso total de la formulación. Además, las formulaciones preferiblemente tienen matriz lipófila, tal como lipogeles y oleolitos, pomadas y emulsiones.

10 Las formulaciones según la invención se pueden preparar por métodos y con ingredientes que son conocidos para el experto en la técnica, por ejemplo, los descritos en Remington, The Science & Practice of Pharmacy, 21 edición.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la formulación es un lipogel que contiene los siguientes ingredientes, en porcentajes en peso indicados a continuación:

Dimeticona	28 - 34%
Acetato de tocoferilo	18 - 26%
Caprilil meticona	16 - 22 %
Aceite de ricino hidrogenado	6 - 10%
Carbonato de dicaprililo	6 - 9%
Estearato de etilhexilo	5 - 7%
Palmitamida MEA	0,5 - 7%
Aceite vegetal	1 - 6%
Extracto total de <i>Calendula officinalis</i> según la invención	0,01 - 6%
Sistema de conservante/antioxidante	c.s. para 100

15 De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, la formulación lipófila es un oleolito que contiene los siguientes ingredientes, en porcentajes en peso indicados al lado:

Ciclopentasiloxano	70 - 80%
Acetato de tocoferilo	18 - 26%
Extracto total de <i>Calendula officinalis</i> según la invención	0,01 - 6%
Aceite vegetal	0,1 - 1%
Tetraisopalmitato de ascorbilo	0.001 - 0,5
Sistema de conservante/antioxidante	c.s. para 100

De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, la formulación es un aceite que contiene los siguientes ingredientes, en porcentajes en peso indicados a continuación:

Pentaisnonanoato de dipentaeritrilo	50 - 60%
Acetato de tocoferilo	15 - 30%
Poliisobuteno hidrogenado	5 - 20%
Tetraisopalmitato de ascorbilo	0,02 - 0,5%
Bisabolol	0,05 - 0,5%
Extracto total de <i>Calendula officinalis</i> según la invención	0,1 - 5%
Tocotrienoles	0,02 - 0,1%

Debido al contenido equilibrado de aceites y ceras, el lipogel, el oleolito y el aceite descritos antes son estables frente a fenómenos de sinéresis típicas de matrices lipófilas; además, optimizan la eficacia del extracto total y aseguran una alta tolerabilidad, a la vez que mantienen una aplicación agradable (extensión, absorción, residuo seco sin sensación aceitosa).

- 5 La invención ahora se describirá con más detalle en la parte experimental y en los siguientes ejemplos.

### Parte experimental

#### Materiales y métodos

##### Material vegetal

- 10 Como materia prima se usaron sumidades floridas de *Calendula officinalis* que se cultivaron en territorio de Valbelluna (BL). Las sumidades completamente floridas se secaron a una temperatura constante de 40°C hasta que se obtuvo una humedad media de menos de 5%. Antes de someterlas a extracción, las sumidades floridas se trituraron con un molino de martillos.

##### Equipamiento

- 15 La extracción con dióxido de carbono supercrítico se llevó a cabo en una instalación de extracción industrial descrita en la solicitud de patente DE 10 2009 023 549 A1, que comprende una cámara de extracción, dos intercambiadores de calor y dos cámaras de recolección corriente abajo de los intercambiadores. El equipamiento para el análisis cualitativo-cuantitativo de los productos de extracción y para los ensayos farmacológicos se indica a continuación.

### Ejemplos

Ejemplo 1 - Extracción de sumidades floridas de *Calendula officinalis* con dióxido de carbono en fase supercrítica

- 20 170 kg de sumidades floridas secas de *Calendula officinalis* se sometieron a extracción con dióxido de carbono, operando como sigue. El material triturado que tenía un tamaño de grano comprendido entre 2 y 5 mm se cargó en una cámara de extracción y se sometió a una presión comprendida entre 600 y 700 bar, manteniendo la temperatura en un intervalo comprendido entre 60 y 70°C; el tiempo de extracción era 230 minutos. Después, la presión del fluido de extracción se redujo a 200 - 300 bar mediante la acción de un intercambiador de calor; de esta forma, se podría  
25 recoger el extracto A en la primera cámara de condensación. La presión del fluido no condensado en esta primera cámara se redujo más a 60-70 bar, obteniendo la separación de una segunda fracción (extracto B) recogida en la segunda cámara de condensación. Se obtuvo un rendimiento de extracción total igual a 8% en peso del fármaco seco total, en particular 1% de extracto A y 7% de extracto B.

- 30 Los extractos A y B se mezclaron en una mezcladora Comer® en una relación en peso 1:9 con el fin de obtener el extracto total usado en la preparación del lipogel y el oleolito descritos en los ejemplos 2 y 3.

Ejemplo 2 - Lipogel que contiene el extracto total de *Calendula officinalis* de acuerdo con el ejemplo 1

Se prepararon 100 g de lipogel con los siguientes ingredientes en las siguientes cantidades:

- |    |                                                                            |         |
|----|----------------------------------------------------------------------------|---------|
|    | Dimeticona (DC200 Fluid, Dow Corning)                                      | 27 g    |
|    | Acetato de tocoferilo (acetato de dl-alfa-tocoferilo, Respharma)           | 24 g    |
| 35 | Caprilil meticona (Dow Corning, Toray FZ - 3196)                           | 18,00 g |
|    | Aceite de ricino hidrogenado (Cutina HR, Cognis)                           | 9,00 g  |
|    | Carbonato de dicaprililo (Cetiol CC, Cognis)                               | 6,00 g  |
|    | Estearato de etilhexilo (Cetiol 868, Cognis)                               | 6,00 g  |
|    | Palmitamida MEA (PMEA, Nikkol)                                             | 7,00 g  |
| 40 | Aceite vegetal (Cegesoft PS17, Cognis)                                     | 1,00 g  |
|    | Extracto total de <i>Calendula officinalis</i> de acuerdo con el ejemplo 1 | 1,50 g  |
|    | Sistema de conservante/antioxidante                                        | 0,5 g   |

#### Preparación

- 45 La fase oleosa adecuadamente pesada (dimeticona, caprilil meticona, aceite de ricino hidrogenado, carbonato de dicaprililo, estearato de etilhexilo, aceite vegetal) se introdujo en un turboemulsionador Comer®. La puerta de carga

5 se cerró y se aplicó vacío (-0,7 atm) al tanque de mezcla. La masa oleosa se mantuvo con agitación, con una pala rotatoria y la otra contrarrotatoria, a una velocidad de 60 rpm y a una temperatura de 75-80°C, con el fin de permitir que las ceras presentes se fundieran adecuadamente. La temperatura después se disminuyó a 65-70°C, se retiró el vacío y se añadieron los siguientes: palmitamida MEA, acetato de tocoferilo, extracto total de caléndula obtenido en el ejemplo 1 y antioxidantes, con agitación constante, después de lo cual se aplicó una vez más vacío (-0,7 atm). El producto se enfrió de una forma gradual, procediendo a intervalos de aproximadamente 5-8°C, interrumpidos por una etapa de turboemulsión, accionando la turbina a 1480 rpm durante 1-3 minutos. Una vez se alcanzó la temperatura de 45-50°C, el producto se enfrió gradualmente, evitando cambios repentinos marcados, la mezcla se mantuvo con agitación hasta temperatura ambiente, después de lo cual se retiró el vacío y el producto se descargó en un recipiente adecuado.

10 Ejemplo 3 - Oleolito que contiene el extracto de *Calendula officinalis* obtenido de acuerdo con el ejemplo 1

Se prepararon 100 g de oleolito con los siguientes ingredientes en las siguientes cantidades:

	Ciclopentasiloxano (DC 245 Fluid, Dow Corning)	78,00 g
	Acetato de tocofenilo (acetato de dl-alfa-tocoferilo)	20,00 g
15	Aceite vegetal (Cegesoft PS17, Cognis)	0,70 g
	Bisabolol (alfa bisabolol natural)	0,10 g
	Tetraisopalmitato de ascorbilo (Nikkol VC-IP)	0,10 g
	Extracto total de <i>Calendula officinalis</i> de acuerdo con el ejemplo 1	1,10 g

Preparación

20 La fase oleosa (ciclopentasiloxano, aceite vegetal), adecuadamente pesada, se introdujo en una mezcladora de palas Cormer con agitación a 60 rpm a temperatura ambiente. Una vez que se había obtenido una solución homogénea, se añadieron los siguientes con agitación constante: tetraisopalmitato de ascorbilo, acetato de tocoferilo, extracto de caléndula obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 y antioxidantes. Una vez obtenido el producto homogéneo, se terminó la agitación y el producto se descargó en un recipiente adecuado.

25 Ejemplo 4 - Aceite que contiene el extracto de *Calendula officinalis* obtenido de acuerdo con el ejemplo 1

	Acetato de tocofenilo (acetato de dl-alfa-tocoferilo, Respharma)	22,00 g
	Tetraisopalmitato de ascorbilo (Nikkol VC-IP, Nikko)	0,10 g
	Poliisobuteno hidrogenado (MC 300)	19,20 g
	Pentaisononanoato de dipentaeritrilo (DUB Vinyl)	57,00 g
30	Tocotrienoles (Mixed Tocotrienols 92)	0,10 g
	Bisabolol (alfa bisabolol natural)	0,10 g
	Extracto total de <i>Calendula officinalis</i> de acuerdo con el ejemplo 1	1,50 g

Preparación

35 Los ingredientes se introdujeron en una mezcladora en una vez, en condiciones en frío; se mezcló hasta obtener un producto homogéneo.

Análisis cualitativo-cuantitativo de los ésteres triterpénicos en los extractos obtenidos de acuerdo con el ejemplo 1

Los extractos A, B y el extracto total obtenido de acuerdo con el ejemplo 1 se sometieron a análisis cualitativo-cuantitativo usando HPLC-APCI-MS y HPLC-DAD.

Materiales y métodos

40 Se usaron los siguientes: un cromatógrafo Agilent 1100 equipado con un detector de diodos series 1100, y un sistema cromatográfico de HPLC Varian series 212 equipado con un detector de trampa iónica Varian MS500, equipado con fuente de APCI (ionización química a presión atmosférica). Como fase estacionaria, se usó una columna Waters X-terra 3,5 x 150 (3,5 micrómetros). Como fase móvil se usó metanol, con elución isocrática. Los parámetros del espectrómetro de masas se dan en la tabla 1.

45 Tabla 1

Parámetro	Valor
Temperatura de la cámara	50°C
Voltaje de protección de pulverización	600 V
Presión del gas nebulizador	4,2 kg/cm <sup>2</sup> (60 psi)
Presión del gas de secado	1,4 kg/cm <sup>2</sup> (20 psi)
Temperatura del gas de secado	150°C
Voltaje del capilar	150 V
Carga RF	70%
Corriente corona	5 $\mu$ A

5 Para la identificación de las sustancias presentes en los extractos, se usaron espectros de masas y fragmentos relativos; en HPLC-APCI-MS, los ésteres de triterpenos estaban presentes como grupos de iones que tienen características m/z, en particular lauratos (iones  $[M-H_2O+H]^+$  607), miristatos (iones  $[M-H_2O+H]^+$  635) y palmitatos (iones  $[M-H_2O+H]^+$  663). Para dichos compuestos también se hicieron mediciones MS/MS.

Además, los compuestos principales presentes en los extractos A y B se aislaron mediante HPLC semipreparativa [Hamburger M. et al, *Fitoterapia* 74, 328-338 (2003)] y sus estructuras se confirmaron por análisis de RMN. Como sustancia de referencia para los análisis cuantitativos, se usó faradiol-3-O-miristato, aislado de los extractos como se describe en Hamburger M. et al, *Fitoterapia* 74, 328-338 (2003). Con el fin de construir la recta de calibración, se prepararon disoluciones de faradiol-3-O-miristato con una concentración comprendida entre 12,7  $\mu$ g/ml y 0,127  $\mu$ g/ml.

15 Se observó que los extractos A y B contenían derivados de los alcoholes terpénicos calenduladiol, arnidiol y faradiol esterificados con ácido mirístico, palmítico y láurico. Como patrón para el análisis cuantitativo, se usó el miristato de faradiol que se había aislado previamente por HPLC semipreparativa como se describe en Hamburger M. et al, *Fitoterapia* 74, 328-338 (2003). La tabla 2 da la cantidad en porcentaje de triterpenos en los extractos A y B obtenidos de acuerdo con el ejemplo 1 y en el extracto total obtenido por mezcla de los mismos.

Tabla 2

Lauratos		% en extracto A	% en extracto B	% en extracto total
	Calenduladiol	0,051 $\pm$ 0,009	0,0416 $\pm$ 0,003	0,0590 $\pm$ 0,003
	Arnidiol	0,135 $\pm$ 0,01	0,0978 $\pm$ 0,009	0,131 $\pm$ 0,006
	Faradiol	0,750 $\pm$ 0,06	0,594 $\pm$ 0,002	0,758 $\pm$ 0,016
Miristatos	Calenduladiol	0,363 $\pm$ 0,010	0,248 $\pm$ 0,009	0,293 $\pm$ 0,010
	Arnidiol	0,876 $\pm$ 0,010	0,683 $\pm$ 0,009	0,809 $\pm$ 0,007
	Faradiol	3,122 $\pm$ 0,092	2,086 $\pm$ 0,011	2,525 $\pm$ 0,014
Palmitatos	Calenduladiol	0,196 $\pm$ 0,010	0,121 $\pm$ 0,009	0,128 $\pm$ 0,009
	Arnidiol	0,516 $\pm$ 0,042	0,364 $\pm$ 0,010	0,448 $\pm$ 0,010
	Faradiol	2,013 $\pm$ 0,091	1,164 $\pm$ 0,010	1,285 $\pm$ 0,040
% Total		8,02 $\pm$ 0,091	5,40 $\pm$ 0,010	6,44 $\pm$ 0,013

20 A partir de estos resultados, se infiere que los compuestos más presentes eran los ésteres de faradiol con ácido mirístico y palmítico.

La siguiente tabla da el contenido en porcentaje de cada éster de triterpeno con respecto a los ésteres de triterpenos en los extractos A y B.

		Extracto A: % de cada éster triterpénico con respecto a los ésteres triterpénicos totales	Extracto B: % de cada éster triterpénico con respecto a los ésteres triterpénicos totales
Lauratos	Calenduladiol	0,64	0,77
	Arnidiol	1,68	1,81
	Faradiol	9,35	11,0
Miristatos	Calenduladiol	4,53	4,59
	Arnidiol	10,9	12,6
	Faradiol	38,9	38,6
Palmitatos	Calenduladiol	2,44	2,24
	Arnidiol	6,434	6,74
	Faradiol	25,1	21,59

El análisis llevado a cabo para la determinación de las sustancias contaminantes mostró una ausencia sustancial de productos contaminantes (metales pesados, plaguicidas y aflatoxinas).

#### Evaluación de la actividad fitoterapéutica

- 5 Con el fin de evaluar de una forma objetiva y reproducible la eficacia del extracto total según la invención y de los productos que contiene, se llevó a cabo un estudio de eficacia in vitro en el instituto Vitoscreen. Este estudio usó técnicas cosmogenómicas y usó tejidos humanos reconstruidos como modelo, en particular el modelo de "Piel de espesor total (FT, por sus siglas en inglés *full-thickness*)" descrito con detalle a continuación. Dichos modelos se consideran reproducibles, predictivos y sensibles para evaluar el mecanismo de acción de las sustancias irritantes (ECVAM -Atla 33 Suppl 1,47-81 -2005).

También se consideran modelos de estudio válidos en investigación biológica de la piel, puesto que tienen la misma morfología de multicapas y la misma funcionalidad que los tejidos in vivo. Además, la absorción de los productos aplicados por vía tópica es modulada por la presencia de la función de barrera, y por lo tanto explica la penetración en la capa córnea.

#### 15 Ensayo en piel humana reconstruida in vitro

La evaluación de la eficacia antiinflamatoria y cicatrizante se llevó a cabo usando el modelo de "piel de espesor total (FT)" (Phenion GmbH & Co, Frankfurt am Main, Alemania) como sistema biológico, en un protocolo experimental de lesión inflamatoria configurado por Vitoscreen. El modelo de piel de FT está constituido por piel humana de múltiples capas, reconstruida in vitro por queratinocitos y fibroblastos que derivan del mismo donante. Después de un periodo de cultivo de 5 semanas, se ha desarrollado completamente el "espesor total" y comprende epidermis, membrana basal y dermis. El modelo se caracterizó con respecto a la expresión de los marcadores fundamentales de diferenciación en el nivel epidérmico (citoqueratina 10, filagrina, transglutaminasa e involucrina), en las uniones dérmica-epidérmica (laminina y colágeno IV) y en el nivel dérmico (elastina, fibronectina).

25 Los modelos de tejido de FT se usaron para el ensayo con 1,3 cm de diámetro, colocados en una cantidad adecuada de medio ALI.

Se examinó lo siguiente en el ensayo:

- el extracto preparado de acuerdo con el ejemplo 1, al 0,5% en aceite de vaselina;
- el lipogel preparado de acuerdo con el ejemplo 2;
- el oleolito preparado de acuerdo con el ejemplo 3.

30 Como control negativo, se usó la piel FT no tratada, mientras que se usó la piel FT dañada y no tratada como control positivo. Como sustancia de referencia, se usó Kenacort® (acetato de triamcinolona).

El tejido se dañó haciendo cuatro incisiones simétricas mediante punzón para biopsia de 2 mm de diámetro, y se trataron inmediatamente con las sustancias a examinar durante 6 h, 48 h y 72 h. Las sustancias se aplicaron por separado sobre la superficie de la piel mediante una micropipeta, en cantidades de 50 µl.

## ES 2 656 153 T3

Al final de la incubación, los tejidos se lavaron con solución fisiológica, se homogeneizaron y se pusieron en 300 µl de tampón de lisis para la extracción del ARN y para la posterior PCR cuantitativa en tiempo real.

La extracción del ARN se llevó a cabo usando el kit RNAqueous® (Applied Biosystems), que permite el aislamiento rápido del ARN en filtro.

- 5 La concentración de ARN se determinó por lectura de la absorbancia a 260 nm y 280 nm en una placa con 96 pocillos transparentes al UV, usando la siguiente fórmula:  $A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 40 = \mu\text{g de ARN/ml}$ .

Después de extracción, el ARN se retrotranscribió en ADNc, el cual se diluyó y se conservó a -20°C.

- 10 Se llevó a cabo la PCR en tiempo real en cada muestra por separado con un termociclador Applied Biosystems 7500 con el siguiente programa: 95°C 10 minutos / 40 ciclos (95°C 15 segundos, 60°C 1 minuto), usando una placa TaqMan® (TaqMan® Array Plate), que contenía 32 genes específicos para la inflamación y cicatrización; en la cuantificación relativa, se usó un control endógeno como referencia positiva para normalizar la cantidad de ADNc diana.

La cuantificación de ADNc se llevó a cabo usando las sondas fluorescentes TaqMan® (Applied Biosystems).

- 15 Durante la adquisición de datos, una sobreexpresión o una regulación negativa de dos veces el valor de control se consideró significativa.

Resultados y discusión

La eficacia de los productos se evaluó observando la expresión de veintinueve genes implicados en las diferentes fases de reparación epidérmica (fase aguda, fase proliferativa y fase de remodelación).

En particular:

- 20 Se evaluaron la respuesta inflamatoria y el proceso de reepitelización que se produce durante la fase aguda observando la expresión de los genes que codifican las siguientes proteínas: IL-1α, IL-8, TNFα, IFNA1, HSP70, MAP3K8, NF-kFB, CD68, MMP2, MMP9, ADAM15, ADAMTS8.

La adhesión celular, que se produce durante la fase proliferativa, se evaluó observando la expresión de los genes que codifican las siguientes proteínas: ITGA1, ITGB2 y RPSA = LAMR1.

- 25 La reorganización del citoesqueleto y los efectos en la movilidad celular se evaluaron observando la expresión de los genes que codifican las siguientes proteínas: VEGF-C, CTNNA1, DNAA1, FLNB, BPI.

En las siguientes tablas 4-6, se da para cada producto ensayado el efecto sobre la expresión génica: el signo + indica que el producto tenía una influencia positiva, es decir, favorecía el proceso de cicatrización, de acuerdo con el mecanismo específico regulado por el propio gen.

Tabla 4 - Efecto del oleolito preparado de acuerdo con el ejemplo 3

Gen expresado	Fase aguda	Fase proliferativa	Fase de remodelación
IL-1		+	+
IL-8	+	+	
TNF- $\alpha$		+	
IFNA1	+		
HSP70	+		
MAP3K8	+	+	
NF- $\kappa$ B	+	+	
MMP2		+	+
MMP9		+	+
ADAM15		+	
ITGA1		+	+
ITGB2		+	+
RPSA=LAMR1		+	
VEGF-C		+	+
CTNNB1		+	
TPM2		+	
BPI	+	+	

Aplicado sobre la superficie de la piel dañada, el oleolito del ejemplo 3 determina:

- 5 - un aumento de la expresión de la IL-1 $\alpha$  e IL-8 por las células epiteliales, estimulando su proliferación y migración durante las fases proliferativa y remodeladora;
- un aumento del TNF- $\alpha$ , que facilita el proceso de reepitelización;
- un aumento del interferón alfa (IFNA1), que está implicado en los procesos de defensa del organismo y en la fase aguda induce la penetración de células dendríticas en la herida;
- 10 - una sobreexpresión temprana de HSP70, una proteína de choque térmico que es expresada en la adaptación a situaciones de estrés;
- aumento inicial de MAP3K8, que promueve la producción de TNF alfa y la activación de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción que tiene una función protectora, limitando la respuesta inflamatoria y fibrogénica;
- sobreexpresión de las metaloproteinasas MMP2-MMP9, que facilita la migración de las células epiteliales a la zona dañada;
- 15 - sobreexpresión de ADAM15, que facilita la cicatrización aumentando la unión con integrinas, la migración de los queratinocitos y la remodelización de la matriz; aumento de las integrinas, que determina cambios en la fuerza mecánica del citoesqueleto facilitando la movilidad celular y cicatrización;
- aumento de LAMR1 (receptor de laminina), que facilita la reepitelización;
- sobreexpresión de VEGF-C por los fibroblastos, que acelera el cierre de la herida;
- 20 - activación de catenina y tropomiosina, proteínas del citoesqueleto que participan activamente en la fase proliferativa de la cicatrización.

## ES 2 656 153 T3

El oleolito de acuerdo con el ejemplo 3 también tiene una acción antibacteriana, puesto que estimula la producción de BPI (proteína bactericida/aumento de la permeabilidad) por fibroblastos dérmicos, ayudando a contrarrestar la inflamación local.

Tabla 5 - Efecto del extracto total preparado de acuerdo con el ejemplo 1 al 0,5% en aceite de vaselina

Gen expresado	Fase aguda	Fase proliferativa	Fase de remodelación
IL-1		+	+
IL-8	+	+	
TNF- $\alpha$		+	
IFNA1	+		
HSP70	+		
MAP3K8	+	+	
NF- $\kappa$ B	+	+	
MMP2		+	+
MMP9		+	+
ADAMTS8		+	
ITGA1		+	+
ITGB2		+	+
VEGF-C		+	+
DNAI1		+	
FLNB		+	
TPM2		+	
BPI	+	+	

5

Como el oleolito del ejemplo 3, el extracto total del ejemplo 1 es particularmente eficaz en la fase proliferativa, pero en cierta medida también afecta a la fase de remodelación; también lleva a cabo una cierta actividad antibacteriana.

El extracto del ejemplo 1 difiere del oleolito del ejemplo 3 en que tiene mayor eficacia cicatrizante; esto se debe a la mejor contracción de las fibras epidérmica y dérmicas, atribuible a una mayor expresión de ADAMTS8, dineína (DNAI1) y filamina beta (FLNB).

10

Tabla 6 - Efecto del lipogel preparado de acuerdo con el ejemplo 2

Gen expresado	Fase aguda	Fase proliferativa	Fase de remodelación
IL-1		+	+
IL-8		+	
TNF- $\alpha$		+	
CD68		+	
MMP9		+	+
ITGB2		+	+
RPSA=LAMR1		+	

VEGF-C		+	+
CTNNB1		+	
DNAI1		+	

5 A partir de lo anterior, se observa que el lipogel actúa en la fase proliferativa, mientras que tiene una acción limitada en la fase de remodelación. De forma análoga al oleolito del ejemplo 3 y al extracto total del ejemplo 2, el lipogel causa el aumento de la expresión de IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , MMP9, ITGB2, RPSA = LAMR1 y VEGF-C; con el oleolito del ejemplo 3, comparte la capacidad de aumentar la producción de CTNNB1, mientras que con el extracto del ejemplo 2, comparte la capacidad para aumentar la expresión de DNAI1.

El lipogel no tiene actividad antibacteriana, puesto que no produce sobreexpresión de BPI. Además, se observó que el lipogel estimula la expresión de CD68; presente en los lisosomas y endosomas y en la superficie celular, este funciona como una molécula depuradora, mediando el reclutamiento y la activación de macrófagos.

10 Tabla 4 - Efecto de Kenacort®

Gen expresado	Fase aguda	Fase proliferativa	Fase de remodelación
TNF- $\alpha$		+	
IFNA1	+		
MMP9		+	+
ITGA1		+	+
CTNNB1		+	
DNAI1		+	
FLNB		+	
TPM2		+	

15 El Kenacort®, usando como producto de referencia, no tiene actividad en la producción de interleuquina (el nivel de expresión del IL8 es equivalente al observado en el tejido dañado, no tratado), mostrando así la migración de las células epiteliales al sitio dañado, un efecto característico de los derivados de cortisona in vivo. También aumenta la expresión de MMP9, pero no la de las proteínas ADAM, ralentizando la cicatrización. Finalmente, actúa en todas las proteínas del citoesqueleto, induciendo una reorganización general tardía del mismo, exactamente como ocurre in vivo.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un procedimiento para extraer sumidades floridas de *Calendula officinalis* que comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar sumidades floridas de *Calendula officinalis*;
  - 5 b) someter dichas sumidades floridas a extracción con dióxido de carbono en fase supercrítica a una temperatura comprendida entre 60 y 70°C y a una presión comprendida entre 600 y 700 bar, durante un periodo de tiempo comprendido entre 200 y 250 min;
  - c) disminuir la presión a 200-300 bar y recoger el extracto A así obtenido;
  - d) disminuir más la presión a 60-70 bar y recoger el extracto B así obtenido.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde la etapa b) se lleva a cabo durante 230 min.
- 10 3. Procedimiento para preparar un extracto total de sumidades floridas de *Calendula officinalis* que comprende la mezcla de los extractos A y B que se pueden obtener según el procedimiento de la reivindicación 1 o 2, etapas c) y d), en una relación en peso comprendida entre 0,5:9,5 y 3:7.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en donde la relación en peso es 1:9.
- 15 5. Extracto de sumidades floridas de *Calendula officinalis* que se puede obtener según el procedimiento de la reivindicación 1 o 2, etapas c) o d).
6. Extracto total de sumidades floridas de *Calendula officinalis* que se puede obtener según el procedimiento de las reivindicaciones 3 o 4.
- 20 7. Extracto de sumidades floridas según la reivindicación 6, para usar como un medicamento, en donde el medicamento está en forma de una formulación tópica que contiene dicho extracto en una cantidad comprendida entre 0,01 y 6% en peso con respecto al peso total de dicha formulación.
8. Formulación farmacéutica o cosmética tópica que contiene el extracto de la reivindicación 6 en una mezcla con excipientes y/o vehículos adecuados, en donde dicho extracto total está contenido en dicha composición farmacéutica o cosmética tópica, en una cantidad comprendida entre 0,01 y 6% en peso con respecto al peso total de dicha formulación.
- 25 9. Uso del extracto total de sumidades floridas según la reivindicación 6 en formulaciones cosméticas, en donde dicho extracto total está contenido en dicha formulación cosmética tópica en una cantidad comprendida entre 0,01 y 6% en peso con respecto al peso total de dicha formulación.