

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 805**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/482** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2014 PCT/IB2014/061488**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14184779**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2014 E 14732396 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2996703**

54 Título: **Extractos de sen y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**16.05.2013 IT RM20130294**

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

**27.04.2018**

73 Titular/es:

**ABOCA S.P.A. SOCIETA' AGRICOLA (100.0%)  
Frazione Aboca 20  
52037 Sansepolcro (AR), IT**

72 Inventor/es:

**MERCATI, VALENTINO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 665 805 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

Extractos de sen y usos de los mismos

5 La presente invención se define en las reivindicaciones 1-17. La presente invención se refiere a extractos de *Cassia acutifolia* y/o *Cassia angustifolia* reducidos en senósidos como agentes protectores de la membrana mucosa, protectores gástricos y/o dermoprotectores, procesos para la preparación de los mismos y composiciones que comprenden dichos extractos.

10 Estado de la técnica anterior

Sen (*Cassia acutifolia* o *Cassia angustifolia*) es una planta cuyas hojas o cuyas vainas (folículos) se usan habitualmente como laxantes.

15 La acción laxante de sen es claramente una acción laxante notablemente irritante, debido a la presencia, en las vainas y las hojas, de antraquinonas conocidas como senósidos.

20 Los constituyentes activos principales en la hoja son senósidos A y B (más los senósidos A1, C, D, G), aproximadamente el 2,5 % de los mismos expresados en contenido de senósido B (C<sub>42</sub>H<sub>38</sub>O<sub>20</sub>; Mr863 de acuerdo con la Farmacopea Europea) y en la vaina, habitualmente mencionada como folículo, dichos componentes son aproximadamente el 4 %, expresados como contenido de senósido B.

25 La acción de los senósidos se debe a su conversión, en el intestino grueso, en el metabolito activo (reinantrona) que tiene un efecto sobre la motilidad del intestino grueso (estimula las contracciones peristálticas e inhibe las contracciones locales) con la consiguiente aceleración del tránsito en el colon y reducción de la absorción de líquidos y un efecto sobre los efectos de secreción (estimulación de la secreción de moco y secreción de cloruro activo) con un aumento en la secreción de líquidos.

30 El método convencional para la valoración de senósidos en hojas y vainas de sen se describe en la Farmacopea Europea 7.0, en los capítulos titulados Sennae folium (páginas 1236 y 1237, Farmacopea Europea 7.0 ed. 2011, 01/2008:0206 corregido 6.0). En la presente descripción, la indicación de senósidos totales presentes en los extractos, indicada como "senósidos totales SFM expresados como senósido B" es lo obtenido por el método indicado anteriormente, es decir, senósidos determinados por método espectrofotométrico de acuerdo con lo que se describe en la Farmacopea Europea mencionada anteriormente.

35 Diferentes formas de cuantificación se indicarán de forma diferente.

40 Por lo tanto, el uso de hojas y/o folículos de sen como laxante, y de sus extractos como laxantes es conocido en la técnica, y también el efecto irritante de dicho producto sobre el intestino es conocido, tanto ligado a la presencia de senósidos en hojas, así como en vainas de la planta de sen.

Sumario de la invención

45 La presente invención se refiere a un extracto de sen sustancialmente reducido en los componentes farmacológicamente activos conocidos representados por senósidos totales, de los cuales permanecen únicamente cantidades mínimas y, opcionalmente, reducido también en resinas, y a un proceso para obtener dicho extracto. El extracto de acuerdo con la invención puede usarse para un fin completamente diferente de para el que se usa el extracto de sen en el estado de la técnica, es decir, como agente protector de las membranas mucosas o de la piel. Dicho uso puede realizarse gracias a las actividades protectoras de los componentes restantes, en que el extracto está enriquecido en un 15-25 % con respecto al producto inicial gracias a la eliminación de los senósidos totales del mismo. El extracto de la invención, por lo tanto, proporciona una nueva fuente de material de origen vegetal útil para la protección de las membranas mucosas y de la piel, donde los efectos farmacológicos atribuibles a los componentes conocidos como principios activos están sustancialmente reducidos o eliminados.

55 Dicha condición es particularmente deseable cuando tienen que usarse materiales de origen natural o vegetal para acciones de un tipo principalmente mecánico (es decir, no para acciones farmacológicas que tienen, por ejemplo, un efecto directo sobre la activación de las rutas receptoriales, las rutas inmunitarias o los procesos metabólicos). El uso de sustancias con un efecto principalmente mecánico, tal como, por ejemplo, sustancias que tienen un efecto de barrera o mucoadhesivo, es deseable, por ejemplo, para ayudar a un tratamiento farmacológico. Minimizando la presencia de sustancias con actividades farmacológicas en el material de origen natural o vegetal como en la presente invención, se obtiene un material con un efecto principalmente mecánico, que puede usarse en combinación con fármacos, minimizando las posibles interacciones indeseadas con fármacos y, al mismo tiempo, explotando la característica típica de las sustancias de origen vegetal, de tener una inmensa cantidad de componentes que pueden ejercer un efecto protector más allá de los farmacológicamente activos habitualmente usados.

El uso de extractos de sustancias complejas vegetales o naturales reducidas en principios farmacológicamente activos implica la doble ventaja de proporcionar un material que tiene una acción protectora principalmente mecánica (protección de la membrana mucosa o protección de la piel) y de posibilitar un uso concreto y útil de materiales normalmente descartados en los procesos de extracción de principios activos vegetales o naturales.

La presente invención, por lo tanto, se refiere a un extracto de sen reducido en senósidos totales, donde dichos senósidos totales tienen una concentración en porcentaje ponderal de al menos  $\leq 0,5\%$ ; su uso como agente protector de piel o membranas mucosas parcialmente comprometidas; composiciones que comprenden dicho extracto; su uso en la protección de la piel o las membranas mucosas y procesos para la preparación de dicho extracto y dichas composiciones.

La invención también se refiere a un proceso para la preparación de extracto de sen como se define anteriormente, que comprende las siguientes etapas:

- a. preparar un extracto hidroalcohólico de hojas y/o vainas de (folículos) de sen donde dicho extracto hidroalcohólico se prepara sometiendo hojas y/o vainas de *Cassia acutifolia* y/o *Cassia angustifolia*, opcionalmente fragmentadas, a dos o más etapas de extracción en etanol en concentración decreciente
- b. obtener del extracto preparado en a. un extracto acuoso concentrado y un extracto resinoso sin senósidos
- c. concentrar dicho extracto alcohólico por decantación y/o centrifugación y/o filtración, recoger el sobrenadante o el filtrado
- d. dicho sobrenadante o filtrado de c. se somete a una o más etapas de ultrafiltración por las que se recoge el permeado y dicho permeado comprende senósidos totales a una concentración en porcentaje ponderal de  $\leq 50,5\%$  y donde dicha una o más etapas de ultrafiltración se realizan en una membrana semipermeable con un punto de corte de aproximadamente 500-15 000 dalton y/o

dicho filtrado o sobrenadante obtenido en la etapa c. o dicho permeado obtenido después de ultrafiltración se somete a una o más etapas a través de una resina de adsorción de alta porosidad y se recoge el eluido donde dicho eluido así obtenido comprende senósidos totales a una concentración en porcentaje ponderal de  $\leq 0,5$ .

Descripción detallada de las figuras

La figura 1 muestra un diagrama de bloques de una realización del proceso de la invención.

La figura 2a muestra un diagrama de bloques de la etapa d y la figura 2b muestra un diagrama de bloques de la etapa d'.

La figura 3 muestra un gráfico de la mucoadhesión en un plano inclinado (ensayo descrito a continuación) en que la sustancia ensayada es etanol de  $50^\circ$  en el panel A (disolvente del extracto), alginato de sodio en el panel B, el extracto de la invención en el panel C, agua en el panel D (disolvente de alginato de sodio).

Los cuadrados indican los resultados obtenidos en un plano inclinado con mucina y la muestra en examen, mientras que los rombos indican los obtenidos en el control (blanco) en que la muestra en examen se ensaya en un plano inclinado sin mucina.

La figura 3A muestra que para EtOH al  $50\%$ , una sustancia no mucoadhesiva, las mediciones del deslizamiento en el plano inclinado con y sin mucina son prácticamente solapables.

Los cuadrados indican los resultados obtenidos en un plano inclinado con mucina y EtOH al  $50\%$ , mientras que los rombos indican los obtenidos en el control (blanco) en que la muestra en examen se ensaya en un plano inclinado sin mucina.

La figura 3B muestra un gráfico de la mucoadhesión en un plano inclinado (ensayo descrito a continuación) en que la sustancia ensayada es alginato de sodio, una sustancia con propiedades mucoadhesivas conocidas.

Los cuadrados indican los resultados obtenidos en un plano inclinado con mucina y alginato de sodio, mientras que los rombos indican los obtenidos en el control (blanco) en que se ensaya alginato de sodio en un plano inclinado sin mucina.

En el caso de la muestra que consiste en alginato de sodio; se evidencia una diferencia notable en el comportamiento en presencia y en ausencia de mucina.

La figura 3C muestra un gráfico de la mucoadhesión en un plano inclinado (ensayo descrito a continuación) en que la sustancia ensayada es el extracto de sen reducido en resinas y senósidos (obtenible, por lo tanto, en el punto d o d' del proceso) de acuerdo con la presente descripción para verificar sus propiedades mucoadhesivas.

Los cuadrados indican los resultados obtenidos en un plano inclinado con mucina y extracto de sen de acuerdo con la presente descripción, mientras que los rombos indican los obtenidos en el control (blanco) en que el extracto de sen de acuerdo con la presente descripción se ensaya en un plano inclinado sin mucina.

La figura 3D muestra un gráfico de la mucoadhesión en un plano inclinado (ensayo descrito a continuación) en que la sustancia ensayada es agua.

5 Los cuadrados indican los resultados obtenidos en un plano inclinado con mucina y agua mientras que los rombos indican los obtenidos en el control (blanco) en que se ensaya agua en un plano inclinado sin mucina.

La figura muestra que para el agua, una sustancia no mucoadhesiva, las mediciones del deslizamiento en el plano inclinado con y sin mucina son prácticamente solapables.

10 Puede apreciarse que el extracto tiene un comportamiento similar al alginato de sodio; se evidencia una diferencia notable en el comportamiento en presencia y en ausencia de mucina, produciendo de ese modo características mucoadhesivas.

#### 15 CORTO GLOSARIO

NMWCO = Punto de corte de peso molecular nominal

FILTRADO: extracto que ha pasado a través de la membrana de ultrafiltración semipermeable o a través del filtro de panel

PERMEADO: extracto que ha pasado a través de la membrana de ultrafiltración.

20 RETENIDO: extracto que no pasó a través de la membrana de ultrafiltración o material adsorbido en resina

ELUIDO: material no adsorbido en resina después de pases de adsorción sobre la misma.

ULTRAFILTRACIÓN: técnica de filtración en membrana semipermeable caracterizada por poros que tienen tamaños de 100 000 dalton (aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ ) a 500 dalton (aproximadamente 0,005  $\mu\text{m}$ )

25 Por "NO MAYOR DE", respecto a las cantidades de principios activos en el extracto, en la presente descripción significa  $\leq$ .

Por "senósidos totales", en la presente invención se entiendo senósidos SFM totales, expresados como senósido B según la referencia en la descripción del estado de la técnica (Farmacopea Europea 7.0 ed. 2011).

30 Para los fines de la presente invención, los porcentajes ponderales presentados se refieren a los extractos secos y son, por lo tanto, porcentajes ponderales de los extractos secos.

Para los fines de la presente invención, el término "sen" se usa para indicar *Cassia acutifolia* y/o *Cassia angustifolia*.

35 Descripción detallada de la invención

Tal como se ha indicado anteriormente, en la presente descripción se proporciona un extracto de sen reducido en senósidos SFM totales expresados como senósido B, donde dichos senósidos totales tienen una concentración en porcentaje ponderal de aproximadamente  $\leq 0,5\%$ . Aplicando el proceso de extracción que es el objeto de la invención, descrito a continuación, y técnicas de separación en membrana semipermeable o en resina, fue posible obtener un extracto de sen resinoso sin senósidos y un extracto de sen reducido en resinas y en senósidos totales, y sorprendentemente enriquecido al mismo tiempo en las sustancias restantes. Ambos extractos mostraron una acción protectora eficaz sobre la piel y sobre las membranas mucosas, como se evidencia por el ensayo de mucoadhesividad y el ensayo de barrera presentados en la sección experimental a continuación.

45 Ambos extractos son útiles como se descritos en la presente invención y también pueden mezclarse juntos para obtener un extracto de sen que comprende resinas y está reducido en senósidos totales.

50 En comparación con los extractos secos de sen y con hojas y/o vainas de sen tal cual, que comprenden una cantidad de senósidos totales de al menos aproximadamente un 4,6 % en peso, el extracto sin resinas, así como el extracto reducido en resinas reconstituido con el extracto resinoso sin senósidos de la presente invención, tiene simplemente cantidades mínimas de dichos principios activos, ya que comprenden una cantidad de senósidos totales de al menos  $\leq 0,5\%$  en peso.

55 Evidentemente, dichos porcentajes son, en la práctica, cantidades mínimas de senósidos totales que no pueden justificar las propiedades mucoadhesivas y de barrera mostradas por el extracto de la invención, y que no pueden inducir las actividades farmacológicas para las que se usa habitualmente sen o los extractos de sen.

60 Como en una realización el extracto está paralelamente reducido en resinas también, eliminándose estas últimas también casi completamente en el proceso de extracción completo como se describe anteriormente, el efecto mucoadhesivo y el efecto de barrera observados para el extracto reducido en resinas de acuerdo con la invención no se puede atribuir a las resinas tampoco.

65 El extracto de la invención, por lo tanto, puede ser

a. extracto resinoso obtenido en la etapa b. del proceso,

- b. extracto reducido en resinas y senósidos, obtenido en la etapa d. del proceso
- c. mezcla de los extractos descritos anteriormente a. y b. en cualquier relación deseada, por ejemplo, 50 % y 50 % u otras relaciones, por ejemplo mezclando las cantidades totales de ambos extractos obtenidos del mismo material inicial.

5 Cada uno de dichos extractos, por lo tanto, es útil por sus propiedades de mucoadhesión y de efecto de barrera en todos aquellos casos en que se necesita o se desea la protección de la piel o las membranas mucosas; estos pueden ser casos en que tiene que administrarse un fármaco que ataca a las membranas mucosas o a la piel, por lo tanto, para prevenir la acción dañina del fármaco, o en aquellos casos en que es preferible o deseable la protección de una piel o membrana mucosa incluso parcialmente comprometida, para posibilitar una curación mejor o más rápida de la misma, defendiéndola de agresiones adicionales, o en aquellos casos en que un individuo tiene un trastorno crónico en que la piel o las membranas mucosas soportan irritaciones o alteraciones, por lo tanto, un efecto de barrera puede prevenir o limitar los daños a la piel o a la membrana mucosa.

15 Al definir el efecto de protección de las membranas mucosas, en la presente descripción se entiende que dichas membranas mucosas pueden ser la mucosa oral, la mucosa gástrica, la mucosa intestinal, la mucosa nasal, la mucosa uterina, la mucosa rectal.

20 La presente invención también proporciona un proceso para la preparación del extracto como se describe anteriormente, comprendiendo dicho proceso las siguientes etapas:

- a. preparar un extracto hidroalcohólico de hojas y/o vainas de (folículos) de sen donde dicho extracto hidroalcohólico se prepara sometiendo hojas y/o vainas de *Cassia acutifolia* y/o *Cassia angustifolia*, opcionalmente fragmentadas, a dos o más etapas de extracción en etanol en concentración decreciente
- 25 b. obtener del extracto preparado en a. un extracto acuoso concentrado y un extracto resinoso sin senósidos
- c. concentrar dicho extracto alcohólico por decantación y/o centrifugación y/o filtración, recoger el sobrenadante o el filtrado
- d. dicho sobrenadante o filtrado de c. se somete a una o más etapas de ultrafiltración por las que se recoge el permeado y dicho permeado comprende senósidos totales a una concentración en porcentaje ponderal de  $\leq$  30 50,5 % y donde dicha una o más etapas de ultrafiltración se realizan en una membrana semipermeable con un punto de corte de aproximadamente 500-15 000 dalton y/o

35 dicho filtrado o sobrenadante obtenido en la etapa c. o dicho permeado obtenido después de ultrafiltración se somete a una o más etapas a través de una resina de adsorción de alta porosidad y se recoge el eluido

donde dicho eluido así obtenido comprende senósidos totales a una concentración en porcentaje ponderal de  $\leq$  0,5.

40 El extracto obtenido en la etapa d. de acuerdo con el método descrito anteriormente tendrá una concentración en porcentaje ponderal de senósidos totales de  $\leq$  0,5 %.

El extracto resinoso obtenido en la etapa b. de acuerdo con el método descrito anteriormente estará libre de senósidos, que permanecen en el extracto acuoso obtenido siempre en b.

45 Como ya se ha mencionado, el objeto de la invención son ambos extractos, así como una mezcla de los mismos.

El proceso descrito en este documento podría realizarse partiendo de hojas y/o vainas (folículos o frutos) de sen.

Los extractos alcohólicos de sen podrían tratarse de acuerdo con el proceso presentado de la etapa b.

50 El extracto de sen seco podrían tratarse de acuerdo con el proceso presentado de la etapa a.

De acuerdo con la invención, el proceso descrito anteriormente puede realizarse realizando un punto a. al menos dos, al menos tres o al menos cuatro etapas en concentraciones decrecientes de etanol, en que las concentraciones decrecientes de etanol varían de aproximadamente un 96 % de etanol a aproximadamente un 0 % de etanol.

55 Por ejemplo, la etapa a. del proceso puede realizarse realizando una etapa en aproximadamente un 85 % de etanol, una etapa en aproximadamente un 50 % de etanol y una etapa en aproximadamente un 20 % de etanol.

60 O, la etapa a. del proceso podría realizarse realizando una etapa en aproximadamente un 85 % de etanol, una etapa en aproximadamente un 50 % de etanol, una etapa en aproximadamente un 20 % de etanol y una etapa en aproximadamente un 5 % de etanol.

65 Los extractos obtenidos como se describe anteriormente se recopilan para formar un extracto hidroalcohólico. Estos pueden recopilarse, por ejemplo, en relaciones mutuas iguales, como 50:50 en el caso de dos etapas en etanol, o como 33,3:33,3:33,3 en el caso de tres etapas en etanol o 25:25:25:25 en el caso de cuatro etapas en etanol.

Evidentemente, los extractos obtenidos realizando las diversas etapas descritas anteriormente en etanol podrían recopilarse en diferentes relaciones, de acuerdo con el conocimiento general de los expertos en el campo.

5 Como ya se ha indicado anteriormente, el extracto hidroalcohólico obtenido en la etapa a. se usará para preparar un extracto acuoso concentrado en la etapa b.

10 Dicho extracto acuoso concentrado podría prepararse concentrando el extracto hidroalcohólico obtenido en a. por evaporación del alcohol y se decanta y/o centrifuga y/o filtra y se recoge la fase concentrada acuosa, por ejemplo, en el caso de decantación y/o centrifugación, se recoge el sobrenadante acuoso, mientras que en el caso de filtración se recoge el filtrado. Como alternativa, la evaporación del alcohol podría realizarse después de la fase de centrifugación y/o decantación y/o filtración.

15 La decantación podría realizarse, por ejemplo, de 1 a 72 horas, y podría estar seguida o remplazada por una o más centrifugaciones a aproximadamente 3000-4000 (por ejemplo, aproximadamente 3500) rpm durante un periodo comprendido entre 1 y 10 minutos, por ejemplo, aproximadamente 5 minutos. Para la filtración, podrían usarse filtros de panel con un punto de corte de 10 a 50 micrómetros. El sobrenadante obtenido después de esta etapa o etapas entonces se recoge y se somete, en caso de no haberse hecho ya anteriormente, a evaporación del alcohol por técnicas convencionales, como, por ejemplo, por el uso de un sistema de destilación de película fina o un sistema de concentración discontinuo de acuerdo con protocolos convencionales habitualmente usados por el experto en el campo.

20 El resultado de esta evaporación es un extracto acuoso concentrado que, en la etapa c. del proceso, se somete a decantación y/o se filtra.

25 El precipitado obtenido después de estas etapas es un extracto resinoso sin senósidos, también objeto de la invención.

30 Por lo tanto, el objeto de la invención también es el proceso que comprende únicamente las etapas a. y b., en que el extracto resinoso obtenido por sedimentación o precipitación se retiene, es decir, un método para la preparación de un extracto de sen sin senósidos, que comprende las siguientes etapas:

- 35
- a. preparar un extracto hidroalcohólico de hojas y/o vainas (folículos) de sen
  - b. obtener del extracto preparado en a. un extracto acuoso y un extracto resinoso sin senósidos, dicho extracto resinoso se recoge.

En este caso, por supuesto, no es necesario concentrar el extracto acuoso.

40 En el método que comprende las etapas a-d, el extracto acuoso concentrado (que también podría mencionarse como solución acuosa concentrada) puede someterse a decantación durante un periodo comprendido entre 1 y 72 horas y el sobrenadante entonces se recupera, obteniendo de ese modo una solución aclarada. La decantación puede estar seguida o remplazarse por una o más centrifugaciones a aproximadamente 3000-4000 (por ejemplo, aproximadamente 3500) rpm durante un periodo comprendido entre 1 y 10 minutos, por ejemplo, aproximadamente 5 minutos.

45 Como alternativa, el extracto acuoso concentrado se filtra, obteniendo de ese modo una solución aclarada. La filtración podría realizarse, por ejemplo, en un filtro de panel con un punto de corte de 10 a 50 micrómetros, como, por ejemplo, un punto de corte de 15-20 micrómetros, o un punto de corte de 25 micrómetros o incluso mayores.

50 En una realización adicional, el extracto acuoso concentrado podría decantarse como se describe anteriormente y el sobrenadante obtenido entonces podría filtrarse como se describe anteriormente.

El sobrenadante o el filtrado obtenido como se describe anteriormente se recupera y se somete a una etapa d. de reducción de senósidos totales.

55 Además, el método comprende una etapa d. de tratamiento del sobrenadante o del filtrado obtenido en una etapa c. descrita anteriormente antes de la recogida del extracto deseado.

60 Esta etapa (d) podría realizarse por ultrafiltración del sobrenadante o del filtrado obtenido en c. y/o por pase a través de una resina de adsorción de alta porosidad del sobrenadante o filtrado obtenido en c. o del permeado obtenido después de ultrafiltración.

En el primer caso, el sobrenadante o filtrado obtenido en c. se somete a una o más etapas de ultrafiltración y el permeado se recupera, donde dicho permeado comprende senósidos totales a una concentración en porcentaje ponderal de  $\leq 0,5$  %.

65

En esta etapa adicional, el extracto acuoso (resultado de la filtración o el sobrenadante de la decantación en c.) se somete a una o más etapas en membranas semipermeables con un punto de corte de peso molecular (NMCWO) de 500 a 50 000 dalton, por ejemplo, de 500, 1000, 2500, 5000, 10 000, 20 000, 50 000 dalton. El extracto de permeado así obtenido está sustancialmente libre de senósidos totales de resinas y sustancias de estructura terpenoide, mientras que está enriquecida en sustancias que tienen una acción protectora puede usarse tal cual o someterse a un proceso de liofilización para proporcionar un extracto liofilizado útil para formulaciones que tienen empleo terapéutico para uso interno y/o externo.

De acuerdo con la invención, por lo tanto, dicha una o más etapas de ultrafiltración podrían realizarse en membranas que tienen un punto de corte de aproximadamente 500-50 000 dalton, por ejemplo, de aproximadamente 10 000 dalton, 5000 dalton y 2500 dalton (corregido).

La presente invención, por lo tanto, también se refiere a un proceso para la preparación de un extracto de sen que comprende las siguientes etapas:

- a. preparar un extracto hidroalcohólico de hojas y/o vainas (folículos) de sen
- b. obtener del extracto preparado en a. un extracto acuoso concentrado y un extracto resinoso sin senósidos
- c. decantar y/o filtrar dicho extracto acuoso recogiendo el sobrenadante o el filtrado
- d. el sobrenadante o filtrado obtenido en c. se somete a una o más etapas de ultrafiltración y el permeado final se recupera (recogido),

donde dicho permeado comprende senósidos totales a una concentración en peso no mayor de 0,5 % ( $\leq 0,5$  %).

Como ya se ha mencionado, opcionalmente el extracto obtenido en b. y el extracto obtenido en d. pueden mezclarse.

De acuerdo con una realización adicional, el método de la invención podría comprender, como alternativa o además de la etapa d. como se describe anteriormente, una etapa d'. donde el filtrado o el sobrenadante obtenido en c. o el permeado obtenido después de ultrafiltración se somete a una o más etapas a través de una resina de adsorción de alta porosidad y el eluido, que consiste en las sustancias no adsorbidas a la resina, se recoge, donde dicho eluido así obtenido comprende senósidos totales a una concentración en porcentaje ponderal de  $< 0,5$ .

La presente invención, por lo tanto, también se refiere a un proceso para la preparación de un extracto de sen que comprende las siguientes etapas:

- a. preparar un extracto hidroalcohólico de hojas y/o vainas (folículos) de sen
- b. obtener del extracto preparado en a. un extracto acuoso concentrado y un extracto resinoso sin senósidos
- c. decantar y/o filtrar dicho extracto acuoso recogiendo el sobrenadante o el filtrado
- d'. el filtrado o el sobrenadante obtenido en c., o el permeado obtenido de una o más etapas de ultrafiltración como se describe anteriormente, se somete adicionalmente a una o más etapas (pases) a través de una resina de adsorción de alta porosidad,

donde dicho eluido así obtenido comprende senósidos totales a una concentración en porcentaje ponderal de  $\leq 0,5$ .

Como ya se ha mencionado, opcionalmente el extracto obtenido en b. y el extracto obtenido en d. pueden mezclarse.

De acuerdo con la presente invención, la etapa en d' puede realizarse en una columna o con resinas que pueden adsorber sustancias aromáticas o altamente apolares y permiten eluir sustancias polares no aromáticas. El material adsorbido a la resina, si se desea, podría desadsorberse con un disolvente adecuado, como, por ejemplo, etanol o disolventes hidroalcohólicos, para otros usos.

Las resinas de cromatografía adecuadas pueden ser, por ejemplo, resinas de adsorción de alta porosidad de copolímero de estireno-divinilbenceno como, por ejemplo, amberlite XAD-2, serdolit PAD-II, ADS TQ 318.

En particular, la resina puede ser una resina que puede adsorber sustancias aromáticas y/o apolares, como, por ejemplo, una resina de adsorción hidrófoba; la resina consiste en microesferas de un diámetro de 0,2 mm - 0,8 mm, con un coeficiente de uniformidad  $\leq 1,5$  obtenida por polimerización de estireno y DVB sin grupos activos, caracterizada por una estructura física altamente porosa y que tiene el parámetro relativo al volumen de poro igual a aproximadamente 1,3 ml/g, lo que posibilita la adsorción y elución selectiva de sustancias orgánicas, preferiblemente de naturaleza aromática. Por lo tanto, el pase a través de resinas que tienen características de adsorción del tipo descrito anteriormente posibilita obtener una fracción (extracto de la invención) reducida en senósidos totales ( $\leq 0,5$  %).

El extracto obtenido con los procesos indicados anteriormente contendrá únicamente cantidades mínimas también de otras sustancias de estructura terpenoide presentes en el producto inicial, además de los senósidos totales.

El extracto obtenible con el método de la invención comprende senósidos totales a una concentración en peso no mayor de un 0,5 % ( $\leq 0,5$  %, donde este producto se menciona como producto seco).

5 Los extractos de acuerdo con la presente invención pueden usarse tal cual o pueden procesarse, por ejemplo, sometiéndolos a secado por liofilización.

10 El extracto obtenido en d o d' tiene las características como, por ejemplo, las presentadas en la tabla 1, donde se compara con el producto inicial, el permeado de ultrafiltración o el eluido de la resina obtenido en d y d', respectivamente.

Tabla 1

Fracción	Rendimiento	senósidos totales (SFM) %
Producto inicial		4-6 %
Extracto objeto de la invención (permeado de < 10 000 dalton obtenido en la etapa d) o eluido obtenido en la etapa d'	55 %	$\leq 0,5$ %
extracto (resinoso) objeto de la invención	10 %	$\leq 0,05$ %

15 El proceso de acuerdo con la presente invención, donde el orden de las etapas como se describe anteriormente posibilita, por lo tanto, obtener un extracto de sen reducido en senósidos totales y sorprendentemente rico en sustancias que tienen una acción protectora. El proceso descrito anteriormente de a. a d. también elimina las resinas mediante los reactivos y etapas usados, como es evidente para un experto en el campo.

20 En una realización de la invención, el extracto de la invención también estará sustancialmente libre de resinas que se encontrarán en el extracto resinoso obtenido en b. y en las fracciones descartadas en c. y d o d'.

25 Sin embargo, el extracto resinoso sin senósidos se recoge y puede usarse tal cual o reunirse con el extracto obtenido en d. o d'.

La presente invención también se refiere a una composición que comprende el extracto de una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente útil en la protección de la piel o membranas mucosas.

Dicha protección, por supuesto con referencia tanto al extracto per se como a la composición, podría ser una protección preventiva o una protección de piel o membranas mucosas parcialmente comprometidas.

30 Por ejemplo, la composición o el extracto puede facilitar, en virtud de su efecto de barrera, la reparación de piel dañada con restauración vinculada de piel sana y elástica.

35 Las lesiones cutáneas de acuerdo con la presente invención son, por ejemplo, lesiones que pueden implicar también el tejido subyacente de la piel y en que no hay presentes heridas abiertas.

Por lesiones cutáneas que no implican la presencia de heridas abiertas, de acuerdo con la presente descripción, se entienden aquellas lesiones en que la capa superficial de la piel y las capas subyacentes, aunque no están heridas, son particularmente frágiles, irritables y están dañadas.

40 Ejemplos no limitantes de este tipo de lesiones están representados por quemaduras de primer grado, lesiones por decúbito de primer grado, lesiones por presión, erupciones recién cicatrizadas, heridas o quemaduras, irritaciones, eritemas.

45 La composición o el extracto de la invención entonces podría usarse para el tratamiento o la prevención de lesiones cutáneas que no implican la presencia de heridas abiertas, o en la prevención o ralentización del empeoramiento de las mismas.

50 Las composiciones de acuerdo con la invención podrían comprender de forma ventajosa componentes adicionales, por ejemplo, de origen vegetal, que tienen, por ejemplo, propiedades emolientes, digestivas, procinéticas, colagógicas, carminativas, probióticas, relajantes, excipientes, conservantes, humectantes.



Cuando la composición o el extracto de la invención se usa para la protección de la piel, la aplicación del mismo será tópica. Las realizaciones de las composiciones para uso tópico se presentan a continuación en este documento en la descripción.

5 La composición de acuerdo con la invención podría prepararse, por ejemplo, como una emulsión de grasa en agua, emulsión de agua en grasa, emulsión de grasa en gel o gel en grasa, emulsiones múltiples, pulverizaciones y formulaciones anhidras (bálsamo, gel, pasta, crema, pomada) y comprenderá uno o más excipientes adecuados para la fabricación de la forma final deseada.

10 Dichos excipientes podrían ser, por ejemplo, agentes emulsionantes (alcohol cetearílico, cetearil glucósido, aceite de ricino hidrogenado), aditivos reológicos, antioxidantes (como, por ejemplo, vitaminas, tocoferoles u otros antioxidantes conocidos en el campo).

15 El agente emulsionante podría ser un tensioactivo, que disminuyendo la tensión interfacial disminuye la energía libre del sistema; como alternativa, también pueden usarse sustancias no tensioactivas, tales como goma arábiga, gelatina, coloides hidrófilos o polvos subdivididos finamente (por ejemplo, talco). En una realización, los excipientes podrían estar presentes a una concentración global en peso comprendida entre un 3 y un 8 %, siendo dicha concentración, por supuesto, indicativa, teniendo en cuenta que cualquier experto en el campo conocerá la manera de adaptar la concentración de los excipientes necesarios de acuerdo con la realización que pretenda preparar sin la adición de actividad innovadora.

20 Además, la composición podría comprender agentes perfumantes y/o colorantes que dan un aroma agradable, como, por ejemplo, uno o más aceites esenciales como, por ejemplo, aceite esencial de lavanda, aceite esencial de melaleuca, limón, menta, naranja y/o agentes colorantes que permiten, por ejemplo, reconocer fácilmente las áreas de aplicación de la composición, siendo la coloración, por ejemplo, temporal, de modo que no interfiera con otras aplicaciones posteriores de la composición.

25 En una realización, dichos agentes colorantes y/o perfumantes están comprendidos a una concentración global en peso de un 0,001 a un 3 %.

30 Por "concentración global en peso" se entiende la concentración en peso en la composición de la suma de los diversos excipientes, o la concentración en peso en la composición de la suma de los diversos agentes perfumantes y/o colorantes presentes en la composición.

35 En cuanto al uso de la composición en la protección de la piel, la invención también se refiere a dispositivos médicos como, por ejemplo, parches medicados, gasas medicadas, vendas medicadas, toallas medicadas, paños medicados, pañales medicados, es decir, parches, gasas, vendas, toallas, paños o pañales que comprenden, o están al menos parcialmente cubiertos por, o están al menos parcialmente impregnados con la composición de la invención descrita en la forma más apropiada.

40 Las gasas podrían fabricarse como gasas vaselinadas, y también las vendas y los parches, usando la composición hecha en forma de, por ejemplo, una pomada, pasta o crema. Las toallas podrían impregnarse con la composición en forma de una emulsión oleosa con agua o gel, y los pañales o paños absorbentes podrían fabricarse insertando la composición en las capas relevantes conocidas en la técnica para la inserción de composiciones protectoras o antiirritantes.

45 Dichos productos, como, por ejemplo, pañales infantiles, paños absorbentes (habitualmente llamados "compresas higiénicas") para mujeres y compresas de incontinencia para adultos, se usan habitualmente, por ejemplo, en los campos relacionados con la infancia, la mujer y la geriatría, y el experto en el campo conocerá dónde insertar la composición descrita en este documento y la realización que es la más adecuada sin la necesidad de contenidos particulares y basándose únicamente en las técnicas convencionales en la técnica.

Dichos dispositivos serán aplicables a la parte a tratar y/o proteger para un fin preventivo.

55 Como ya se ha indicado anteriormente, la composición de la invención puede ser una composición para uso tópico que podría lograrse en forma de una emulsión de grasa en agua, emulsión de agua en grasa, emulsiones múltiples, pulverizaciones y formulaciones anhidras (bálsamo, ungüento, gel, pasta, crema, pulverización), de acuerdo técnicas habitualmente usadas en el campo. La formulación indicada en este documento como "pulverización" podría ser una formulación anhidra o incluso una formulación en emulsión, posibilitando la forma con un atomizador también autoaplicaciones en zonas más difíciles de alcanzar (como, por ejemplo, la espalda), útil en todos aquellos casos en que se usa la formulación, por ejemplo, para aliviar erupciones solares, eritema o irritaciones cutáneas de diversos tipos.

60 De acuerdo con otra realización, el extracto o la composición de la invención podría usarse, gracias a sus efectos mucoadhesivos y de barrera, para la protección de las membranas mucosas.

En este caso también, dicha protección podría ser una protección preventiva, por ejemplo, en todos aquellos casos que prevén una administración de fármacos que tienen el efecto secundario de atacar las membranas mucosas o en aquellos pacientes que muestran afecciones de irritación recurrente de las mismas. En otros casos, la protección podría ser, en su lugar, una protección con fines curativos o para evitar el empeoramiento de membranas mucosas irritadas o parcialmente comprometidas.

En estos casos, la administración del extracto o de la composición podría ser tópica para todas aquellas membranas mucosas en que es posible una administración tópica (por ejemplo, mucosa oral, rectal, vaginal, nasal) u oral en los casos en que dichas membranas son, por ejemplo, membranas mucosas intestinales o gástricas.

Las composiciones para la protección de las membranas mucosas, por lo tanto, podrían fabricarse en forma de cápsula, comprimido, gragea, gránulo, polvo, jarabe, elixir, gelatina dura, gelatina blanda, suspensión, emulsión, solución, supositorio, crema, gel, pulverización, ungüento, pomada, pasta, emulsión de grasa en agua, emulsión de agua en grasa, emulsión de grasa en gel, emulsión de gel en grasa.

En caso de formulaciones para uso tópico, podrían seguirse las indicaciones anteriores referidas a las composiciones para la protección de la piel, o podrían fabricarse jarabes, enjuagues, pulverizaciones, por ejemplo, para la protección de las membranas mucosas de la boca, la garganta, la nariz.

Para la aplicación en la membrana rectal, podrían usarse supositorios o enemas o microenemas, con los excipientes conocidos para el experto en el campo para la fabricación de dichas composiciones.

Como ya se ha mencionado, la composición de la invención podría estar en forma de cápsula, comprimido, gragea, gelatina dura, gelatina blanda, gránulo, polvo, jarabe, elixir, suspensión, emulsión. Para administración oral, la composición podría fabricarse en forma de monodosis diarias o de fracciones de monodosis diarias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más cápsulas, comprimidos, grageas, gránulos o dosis individuales de polvo, o podrían tomarse gelatinas durante el día, de acuerdo con el criterio del doctor a cargo), y pueden contener excipientes convencionales incluyendo, por ejemplo, agentes aglutinantes, como goma arábica, gelatina, sorbitol, goma de tragacanto y/o polivinilpirrolidona; cargas, como lactosa, azúcar, almidón de maíz, almidón de arroz, fosfato de calcio, sorbitol y/o glicina; lubricantes de formación de comprimidos, como estearato de magnesio, talco, polietilenglicol y/o sílice; disgregantes, como almidón de patata; y humectantes como laurilsulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica convencional.

La composición también podría fabricarse en una forma líquida o semilíquida, como una suspensión, emulsión, solución para administración oral y podría contener opcionalmente agentes aromatizantes naturales que dan un sabor agradable a la misma.

La composición en forma de polvo o gránulo podría estar premedida en recipientes adecuados y lista para su uso, por ingesta tal cual o a resuspender en un líquido apropiado tal como agua, té, etc. En este caso también, la composición podría contener agentes aromatizantes naturales que dan sabor agradable a la misma.

Evidentemente, todos los excipientes indicados anteriormente podrían usarse en una calidad farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición como se describe en este documento, en una cualquiera de las realizaciones indicadas anteriormente, podría estar en forma de composición farmacéutica, es decir, podría comprender ingredientes de calidad farmacéutica o podría ser o introducirse en un alimento con fines especiales (alimento médico) o en un dispositivo médico.

La composición de acuerdo con la presente descripción podría fabricarse en forma de composición farmacéutica o de dispositivo médico de acuerdo con una cualquiera de las clases descritas en la Directiva 93/42/EEC sobre dispositivos médicos (que comprende también sustancias y no únicamente "dispositivos" en el sentido mecánico del término) o en forma de alimento médico, suplemento alimenticio o en cualquier forma de acuerdo con las disposiciones reguladoras del país en que se producirá dicha composición.

El alimento médico también podría contener como ingredientes otros componentes que comprenden, por ejemplo, combinaciones de vitaminas, sales minerales y otras sustancias dirigidas a complementar la dieta.

El extracto o la composición de la invención, por lo tanto, es útil por sus propiedades de mucoadhesión y de efecto de barrera en todos aquellos casos en que se necesita o es deseable la protección de la piel o las membranas mucosas; estos pueden ser casos en que tiene que administrarse un fármaco que ataca a las membranas mucosas o a la piel, por lo tanto, para prevenir o limitar la acción dañina del fármaco, o en aquellos casos en que es preferible o deseable la protección de una piel o membrana mucosa parcialmente comprometida para posibilitar una curación mejor o más rápida de la misma, defendiéndola de agresiones adicionales, o en aquellos casos en que un individuo tiene un trastorno crónico en que la piel o las membranas mucosas soportan irritaciones o alteraciones, por lo tanto, un efecto de barrera puede prevenir o limitar los daños a la piel o a la membrana mucosa.

La invención también se refiere a un método para el tratamiento o para la prevención de la aparición o el empeoramiento de lesiones cutáneas que no implican la presencia de heridas abiertas, donde dicho método comprende una o más aplicaciones de la composición de la invención o del dispositivo médico que la comprende una vez o más por día en la parte afectada.

5 La aplicación de la composición, por ejemplo, podría repetirse siempre que sea necesario (por ejemplo, en cada cambio de paño en caso de prevención de erupciones relacionadas con incontinencia) o una vez, dos veces, tres veces, cuatro o más veces al día en general.

10 La invención también se refiere a un método para la preparación de una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, donde un extracto de sen reducido en senósidos totales, donde dichos senósidos totales tienen una concentración en porcentaje ponderal de  $\leq 0,5\%$ , se mezcla con al menos un excipiente y/o una sustancia de origen natural y/o vegetal que tiene propiedades emolientes, digestivas, procinéticas, colagógicas, carminativas, probióticas, relajantes, excipientes, conservantes, humectantes como se describe anteriormente.

15 Entre estas, por ejemplo, podría usarse una o más de: extracto de raíz de genciana, extracto foliar de boldo, extracto del fruto de cardo de leche, extracto de hojas de alcachofa, extracto de raíz de diente de león, extracto del fruto de anís, extracto foliar de romero, extracto foliar de menta, extracto foliar de mejorana, extracto del fruto de comino, extracto del fruto de cilantro, extracto de la raíz de jengibre, extracto del fruto de hinojo, extracto del fruto de alcaravea, carbón vegetal, inulina, gel foliar de aloe.

20 El objeto de la presente invención también es un método para su uso en el tratamiento protector (preventivo o curativo) de la piel o las membranas mucosas, proporcionando la administración del extracto o la composición de la presente invención a un paciente que lo necesita. Dicha administración también podría ser de forma concomitante con la administración de otros fármacos.

25 La ausencia de principios farmacológicamente activos de sen en el extracto o en la composición hace que dichos productos sean particularmente adecuados para la administración de forma concomitante con otros fármacos, ya que un efecto secundario de interacción entre el extracto o la composición de la invención y el fármaco coadministrado o administrado de forma concomitante es bastante improbable.

30 Un ejemplo no limitante del método de tratamiento y/o de prevención de la piel o las membranas mucosas, podría comprender la administración, subdividida en una única dosis o múltiples dosis, descritas en la mezcla o composición de acuerdo con la presente descripción, durante un periodo de tiempo entre una y seis semanas, por ejemplo, entre tres y seis semanas o incluso durante un periodo de tiempo mayor de seis semanas, de acuerdo con el criterio del médico a cargo.

35 Dicha administración podría preceder a la administración del fármaco incluso durante un periodo prolongado, para optimizar el estado de salud de piel o de la membrana mucosa a tratar.

El médico a cargo conocerá el modo de establecer tanto la dosificación más apropiada como los tiempos de administración también basándose en el estado de salud del paciente, el peso, el género y la edad.

40 Una de las diferencias sustanciales entre la estructura de la piel y la de las membranas mucosas está representada por la ausencia, en las membranas mucosas, de una barrera selectiva tal como la capa córnea. Las membranas mucosas orales contactan con sustancias nocivas o irritantes presentes en el entorno (contaminantes, microorganismos patógenos, etc.), por lo tanto, pueden causar una alta penetración de dichas sustancias tanto dentro de las membranas mucosas como en las vías respiratorias relacionadas (bronquios, pulmones, etc.) causando inflamación y/o patologías alérgicas.

El efecto protector del extracto de la presente invención se evaluó por ensayos de mucoadhesión y ensayos del efecto de barrera.

55 Lo anterior tiene como objetivo evaluar la mucoadhesividad del producto en examen para establecer si dicho producto tiene la capacidad de adherirse a las membranas mucosas y, por consiguiente, ejercer una acción protectora.

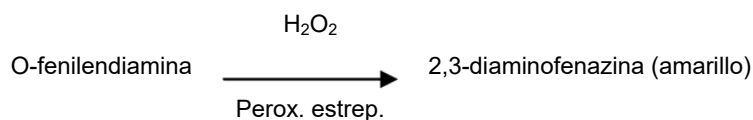
60 Por ejemplo, están disponibles dos modelos simples para evaluar la mucoadhesividad del producto de interés. El primero, por ejemplo, evalúa la capacidad mucoadhesiva de la muestra midiendo su capacidad de unirse a mucina dispuesta en un plano inclinado, que permite el movimiento por deslizamiento de la muestra sin capacidad mucoadhesiva. El segundo posibilita evaluar la capacidad mucoadhesiva de la muestra por inhibición del enlace de lectina/glucoproteína expresado en la membrana celular, de células que provienen de una membrana mucosa.

Para la evaluación del efecto de barrera, está disponible un modelo *in vitro* que posibilita evaluar el impedimento de la muestra al tránsito de LPS, responsable, en el modelo, de liberar mediadores tales como interleucina 6 (IL-6), medida de forma semicuantitativa por ensayo ELISA.

5 Evaluación del porcentaje de inhibición del enlace de lectina/glicoproteína

10 En el primer modelo, se determinó la mucoadhesividad por evaluación del porcentaje de inhibición del enlace de lectina/glicoproteína. En este modelo, por ejemplo, pueden usarse células de la mucosa bucal o vaginal. Las células se trataron inicialmente con lectina biotilada (Con-A), que tiene alta afinidad por los restos de glucósido y manósido presentes en las glicoproteínas de la membrana. Los sitios de las glicoproteínas de las membranas mucosas, por tanto, se ocuparán con la lectina biotilada. La presencia de la biotina (vitamina H) en la lectina es indispensable para la siguiente fase. Las células ya tratadas con lectina biotilada se cargan con peroxidasa de estreptavidina, haciendo posible formar el complejo de proteína/glucosa/lectina/biotina/peroxidasa de estreptavidina. En este punto, las células se lavan y se cuantifica el complejo de proteína/glucosa/lectina/biotina/peroxidasa de estreptavidina, gracias a la presencia de la peroxidasa, mediante una reacción de oxidación de la orto-fenilendiamina.

El complejo de proteína/glucosa/lectina/biotina/peroxidasa de estreptavidina cataliza la reacción de polimerización:



20 La intensidad de la coloración amarilla/naranja de la solución (medida usando un espectrofotómetro con  $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) es proporcional a la cantidad de enlaces de glicoproteína/lectina y, por lo tanto, a la cantidad de sitios disponibles (glicoproteínas) para mucoadhesión. El valor de absorbancia determinado de esta manera constituye el "control".

25 En el ensayo de mucoadhesión presentado a continuación, las células de la mucosa se tratan durante aproximadamente 15 minutos a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  con el producto en examen antes del tratamiento con lectina. En presencia de productos mucoadhesivos, dichos productos inhibirán el enlace de lectina, disminuyendo, proporcionalmente a su capacidad de mucoadhesión, la fuerza de la señal en la muestra en comparación con la de control como se describe anteriormente.

30 El porcentaje de mucoadhesión del producto (% MA) podría determinarse como

$$\% \text{ MA} = (1 - \text{abs. muestra}/\text{abs. control}) \times 100$$

35 Evaluación del porcentaje de adhesión por la plano inclinado con mucina.

Las mediciones se realizan por un equipo compuesto de un plano inclinado a  $45 \text{ }^\circ$ , termorregulado a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; por debajo de dicho plano se establece una microbalanza, que realiza mediciones a intervalos regulares de 1 s e imprime las mediciones registradas en papel. Las mediciones realizadas entonces se transcriben y vuelven a procesar en hoja de cálculo de Excel.

40 El plano inclinado actúa como soporte para el sustrato biológico, que consiste en una película de mucina configurada por deposición, sobre un plano de plexiglás mantenido horizontal, un volumen igual a 3 ml de una suspensión de mucina gástrica porcina a una concentración de un 8 % (p/p) en un tampón fosfato, pH 6,4.

45 La dispersión entonces se lleva a sequedad a la temperatura de  $44 \text{ }^\circ\text{C}$  para obtener una película de área superficial conocida igual a  $33,6 \text{ cm}^2$ .

50 Se disuelve una cantidad exactamente pesada del extracto de acuerdo con la invención en un disolvente. El extracto entonces se deposita sobre el plano de medición con una pipeta multicanal a tiempo y tasa constantes durante 6 segundos.

La pipeta multicanal se calibra para medir la solución (o dispersión) sobre el plano de trabajo. La cantidad total se mide en cada ensayo (el peso de dicho volumen se mide antes del ensayo y depende de la densidad de la muestra en análisis).

55 La muestra, que caerá en la microbalanza al final del procesamiento, se carga en la parte superior del plano inclinado, que contiene la película de mucina y se deja deslizar sobre la misma. La cantidad de muestra que ha caído se mide registrando la variación de peso como una función de tiempo. El ensayo hecho en este documento dura 40 segundos, aunque habitualmente después de 20 segundos no hay variación en el peso.

60 También se realizan mediciones en ausencia de la película de mucina sobre el plano inclinado (mediciones indicadas como blanco) con las mismas cantidades de muestra y en las mismas condiciones de ensayo.

Por tanto, es posible evaluar las propiedades de deslizamiento intrínsecas de la muestra, independientemente de su capacidad de interactuar con el sustrato biológico.

5 Se calcula el % adherido: definido como la cantidad de muestra que permanece adherida a la película de mucina o al plano inclinado (sin mucina, blanco) al final de la medición, normalizada con respecto a la cantidad depositada sobre el plano inclinado.

Además, se determina la diferencia porcentual entre la cantidad de muestra adherida al plano con mucina y la cantidad de muestra adherida al plano sin mucina. El cálculo se realiza de acuerdo con la siguiente ecuación:

10 
$$\% \text{ diferencia} = (\% \text{ de mucina adherida} - \% \text{ de blanco adherido}) / \% \text{ adherido del blanco}$$

donde

- 15
- % de mucina adherida = porcentaje de la muestra que permanece adherida a la película de mucina al final de la medición
  - % de blanco adherido = porcentaje de la muestra en el plano inclinado al final de las mediciones del blanco.

20 Ensayo de efecto de barrera

El ensayo de efecto de barrera es un ensayo *in vitro* de tipo biológico empleado para evaluar la capacidad de los productos acabados y/o las materias primas de proteger, a través de la formación de una delgada capa "aislante", las membranas mucosas y la piel del contacto con contaminantes ambientales (polvo, pólenes, microorganismos, etc.).

25 El ensayo se desarrolló para simular *in vitro* la acción ejercida por productos que se aplican sobre la piel y/o las membranas mucosas con el objetivo de crear una película protectora contra agresores externos.

30 El modelo aprovecha el principio por el que las células sometidas a contacto con un agente inflamatorio producen y secretan mediadores proinflamatorios (citocinas) en el entorno extracelular en una cantidad relacionada con el grado de inflamación causado; dentro de un determinado intervalo, existe una proporcionalidad directa entre la concentración y los tiempos de exposición al agente inflamatorio y las cantidades de citocinas liberadas.

35 El modelo experimental adoptado proporciona dos cámara físicamente separadas por una membrana semipermeable (poros de 0,4 µm). Las células se siembran en la cámara inferior, mientras que la cámara superior acomoda el agente inflamatorio; en la membrana semipermeable que separa las dos cámaras se estratifica una película fina de la muestra en análisis para resaltar, si estuviera presente, un efecto de barrera al tránsito libre del agente inflamatorio.

40 La membrana semipermeable permite el pase del agente inflamatorio a la cámara inferior y constituye el soporte sobre el que la muestra a ensayar se estratifica. Dependiendo de la capacidad "aislante" de la muestra, se obtendrá una disminución de la migración de LPS de la cámara superior a la inferior (por lo tanto, una menor estimulación de células para la producción de citocinas).

#### 45 Ejemplos

Ejemplo 1

50 Preparación de extracto

Se fermentaron hojas y/o vainas (folículos) de sen y se sometieron a cuatro etapas de extracción en etanol a concentraciones decrecientes; realizando una etapa en etanol al 85 %, una etapa en etanol al 50 %, una etapa en etanol al 20 %, una etapa en etanol al 5 %.

55 Los extractos alcohólicos obtenidos como se describe se recopilaron en una relación de 25:25:25:25 y se sometieron a centrifugación durante un tiempo de 1-5 minutos a una velocidad de rotación igual a 3500 rpm; el sobrenadante se recuperó y se concentró por evaporación de etanol con el uso de un sistema de destilación de película fina de acuerdo con el protocolo convencional, proporcionando el suministro del extracto a concentrar a una velocidad de aproximadamente 500 l/h; la operación fue ajustando un vacío residual de 0,6-0,8 bares y el líquido que calienta las paredes de evaporación se estableció a 140 °C, obteniendo de ese modo, después de la eliminación del etanol, un extracto acuoso concentrado.

60 El precipitado, o el extracto resinoso, se recogió y se demostró que estaba libre de senósidos.

65 El extracto acuoso así obtenido se filtró en un filtro de panel con un punto de corte de 25.

El filtrado así obtenido, que comprendía senósidos totales en una concentración en peso no mayor de un 5 % se sometió a una etapa de ultrafiltración en membrana con un punto de corte de 10 000 dalton y/o 5000 dalton y/o 2500 dalton de acuerdo con metodologías convencionales.

5 El permeado final así obtenido comprendía senósidos totales a una concentración en peso de no más de un 0,5 %.

10 El extracto acuoso concentrado, después de la sedimentación y la recuperación del sobrenadante o después de la filtración y recuperación del permeado, se sometió, de forma alternativa o adicional, al proceso de ultrafiltración descrito anteriormente, a un tratamiento con resina de adsorción de alta porosidad; en particular, se usó una resina de copolímero de estireno-DVB del tipo ADS TQ 318. Evidentemente, podría usarse cualquier resina de adsorción con características similares en la realización de la presente invención.

15 En este caso, un proceso convencional de obtención del extracto por tratamiento en resina implica la introducción del extracto acuoso concentrado en una columna cromatográfica que contiene la resina de adsorción. El líquido de suministro debe tener sólidos suspendidos comprendidos de forma indicativa entre 0,2 a 10 ° Brix. La tasa de suministro está comprendida entre 1 y 4 BV/hora y preferiblemente 2BV/hora. El eluido acuoso correspondiente se recoge y somete a secado por liofilización o a desecación. Las sustancias adsorbidas en la resina se eluyen usando alcohol etílico al 96 % o metanol o acetona, o mezclas acuosas con los disolventes presentados hasta ahora, preferiblemente alcohol etílico al 96 %. En este último caso, el eluido alcohólico se somete a deshidratación y a liofilización (después de haber añadido, en este último caso, agua en una relación de 1:1 v/v con el eluido alcohólico y de haber evaporado el etanol), útil para otros propósitos.

20 Los senósidos restantes se retienen por la resina y se recoge el eluido. Por este proceso, se obtiene un extracto que comprende senósidos totales a una concentración no mayor de un 0,5 % (valor referido al producto directo, por ejemplo, por liofilización) y, cuando se realizan ambas etapas d. (ultrafiltración y adsorción en resina), la concentración de senósidos está más reducida.

25 Los siguientes ejemplos presentan los datos sobre el extracto reducido en resinas y senósidos y sobre el extracto resinoso reducido en senósidos de acuerdo con la invención.

30 Ejemplo 2

Evaluación de la capacidad mucoadhesiva del extracto de la invención por evaluación del porcentaje de inhibición del enlace de lectina/glicoproteína

35 Se raspó suavemente la cavidad oral de 8-10 hombres y mujeres donantes (edad: 20-35 años), sin alimento durante al menos 60 minutos, con una espátula de madera y las células se sumergieron en TBS 0,05 M (solución salina con tampón Tris) pH 7,6. Después de recuento con azul tripano al 0,5 %, las células se diluyeron con NaCl al 0,9 % hasta obtener una concentración final de 480 000 células para cada muestra a usar en el ensayo. Las células se mantuvieron a una temperatura de 4 °C. Las suspensiones celulares después se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se incubaron con 5 ml de una solución que contenía extracto de la invención al 0,5 %. Para el control, las suspensiones celulares se incubaron en su lugar con 5 ml de NaCl al 0,9 %. La incubación se realizó durante 15 minutos a la temperatura de 30 °C, con agitación suave. Después de 3 lavados con TBS, las células bucales se incubaron con 5 ml de 10 mg de L-1 de Con-A a 30 °C durante 30 minutos, se lavaron 3 veces con TBS y después se incubaron a 30 °C durante 60 minutos con 5 ml de 5 mg L-1 de peroxidasa de estreptavidina. Después de 3 lavados con TBS, se añadieron 240 000 células por muestra a 2,5 ml de o-fenilendiamina (o-pd) en fosfato citrato 0,05 M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la reacción se detuvo después de 5 minutos con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.

40 Después, se leyeron los valores de absorbancia para las determinaciones individuales por espectrofotómetro (experimento realizado por triplicado). Como la composición tiene una coloración que podría interferir con la determinación exacta del valor de adsorbancia registrado al final del protocolo, para la lectura de la muestra se usó una solución de NaCl (0,9 %) (para el control) o la solución del producto adecuadamente diluido con solución de NaCl al 0,9 % como blanco. Las muestras individuales se ensayaron 3 veces y los resultados presentados representan los promedios ± ETM de todos los ensayos realizados.

Muestra	% de mucoadhesión de EXTRACTO DE SEN OBTENIDO EN D	% de mucoadhesión de RESINAS DE EXTRACTO DE SEN
A	48	31,5
B	50	34
C	53	28,9
Promedio ± D.T.	50 ± 2,50	31,5 ± 2,55

Los resultados obtenidos demuestran que el extracto ensayado posee una alta capacidad mucoadhesiva con respecto a membranas mucosas de la cavidad oral. A la luz de los resultados obtenidos, es posible afirmar que la

composición, que demuestra tener alta mucoadhesividad resistente, puede desempeñar una función protectora interesante sobre células de la mucosa.

Ejemplo 3

5

Evaluación de la capacidad mucoadhesiva del extracto de la invención en un plano inclinado

Se realizaron mediciones mediante un equipo que consiste en un plano inclinado a 45 °, termorregulado a 37 °C; por debajo de dicho plano se establece una microbalanza, que realizó las mediciones a intervalos regulares de 1 s e imprimió las mediciones registradas en papel. Las mediciones realizadas se transcribieron y volvieron a procesar en hoja de cálculo de Excel.

10

El plano inclinado actúa como soporte para el sustrato biológico, que consiste en una película de mucina. La película de mucina se estableció depositando, en el plano que consiste en plexiglás mantenido horizontal, un volumen igual a 3 ml de una suspensión de mucina gástrica porcina a una concentración de un 8 % (p/p) en un tampón fosfato, pH 6,4.

15

La dispersión se llevó a sequedad a la temperatura de 44 °C para obtener una película de área superficial conocida igual a 33,6 cm<sup>2</sup>. La cantidad, concentración y plano de depósito se definieron durante el desarrollo del proceso.

20

Se disolvió una cantidad pesada de forma exacta del extracto de la invención en disolvente (etanol de 50 °, posteriormente diluido a 1:2 en medio de tipo Eagle MEM con BSS de Earle; concentración de la muestra: 10 mg/ml o 1 %). El extracto se depositó sobre el plano de medición con una pipeta multicanal a tiempo y tasa constantes durante 6 segundos.

25

La pipeta multicanal se ajustó para medir 250 microlitros de solución (o dispersión) sobre el plano de trabajo. La cantidad total medida en cada ensayo es de aproximadamente 1 ml por muestra (el peso de dicho volumen se mide antes del ensayo y depende de la densidad de la muestra en análisis).

La muestra, que caería en la microbalanza, se cargó en la parte superior del plano inclinado, que contiene la película de mucina y se dejó deslizar sobre la misma.

30

La cantidad de muestra que ha caído se midió registrando la variación de peso como una función del tiempo.

El ensayo duró 40 segundos, sin embargo, es destacable que después de 20 segundos no hubo variación de peso.

35

También se realizaron mediciones en ausencia de película de mucina (mediciones indicadas como blanco) con las mismas cantidades de muestra y en las mismas condiciones de ensayo, pero sin la capa de mucina depositada sobre el plano.

40

Por tanto, es posible evaluar las propiedades de deslizamiento intrínsecas de la muestra, independientemente de su capacidad de interactuar con el sustrato biológico.

Se calcula el % adherido: definido como la cantidad de muestra que permanece adherida a la película de mucina o al plano inclinado (sin mucina, blanco) al final de la medición, normalizada con respecto a la cantidad depositada sobre el plano inclinado.

45

Además, se determina la diferencia porcentual entre la cantidad de muestra adherida al plano con mucina y la cantidad de muestra adherida al plano sin mucina. El cálculo se realiza de acuerdo con la siguiente ecuación:

50

$$\% \text{ diferencia} = (\% \text{ de mucina adherida} - \% \text{ de blanco adherido}) / \% \text{ adherido del blanco.}$$

donde

- % de mucina adherida = porcentaje de la muestra que permanece adherida a la película de mucina al final de la medición
- % de blanco adherido = porcentaje de la muestra en el plano inclinado al final de las mediciones del blanco.

55

Muestras analizadas:

60

Las mediciones se realizaron para las siguientes muestras:

- EtOH al 50 % en agua: usado como control negativo, es decir, como una solución sin mucoadhesión
- alginato de sodio al 0,7 % en agua usado como control positivo, es decir, como sustancia con propiedades mucoadhesivas conocidas
- Muestra de sen: fracciones de sen liofilizadas, solución al 1 % en EtOH al 50 %.

65

Resultados

En los gráficos presentados en la figura 3 (paneles A, B, C, D) se representan, respectivamente, los perfiles de deslizamiento obtenidos con el control negativo (EtOH al 50 % en agua), el control positivo (alginato de sodio al 0,7 %), la muestra en análisis (fracción de sen soluble en EtOH al 50 %, solución al 1 %) y la muestra en análisis (fracción de sen no soluble en EtOH al 50 %, solución al 1 %).

A partir de las figuras, es evidente que la cantidad deslizante de sustancias mucoadhesivas en presencia de mucina son en cada momento definitivamente inferiores que las que han caído en las mediciones de blanco, lo que indica que se ha producido interacción entre la formulación y el sustrato biológico. Dicha diferencia permanece al final de la medición.

Las figuras también demuestran que, a pesar de la eliminación de resinas (eliminadas junto con los senósidos totales), el extracto de sen de acuerdo con la presente invención mantiene una buena capacidad mucoadhesiva.

En la siguiente tabla se presentan los parámetros de mucoadhesión, medidos como se describe en las sección experimental.

Se evaluó el porcentaje de muestra adherida al plano inclinado sin mucina y con mucina y se calculó la diferencia porcentual entre los dos valores, para el extracto obtenido con el proceso de acuerdo con la reivindicación 5, etapas a-d, para alginato de sodio, que una sustancia con capacidad mucoadhesiva conocida y para el disolvente.

Tabla 2 A

	% de DIFERENCIA (entre el % adherido al plano inclinado con mucina y sin mucina)
Extracto de la invención (% de muestra adherida a película de mucina - % de muestra adherida al plano sin mucina)/ % de muestra adherida al plano sin mucina	117 %
ALGINATO DE SODIO al 0,7 %, (% de muestra adherida a la película de mucina - % de muestra adherida al plano sin mucina)/ % de muestra adherida al plano sin mucina	127 %
Etanol al 50 % (% de muestra adherida a la película de mucina - % de muestra adherida al plano sin mucina)/ % de muestra adherida al plano sin mucina	23 %

25

Tabla 2 B

	% de DIFERENCIA (entre el % adherido al plano inclinado con mucina y sin mucina)
Extracto de la invención - RESINAS (% de muestra adherida a película de mucina - % de muestra adherida al plano sin mucina)/ % de muestra adherida al plano sin mucina	25 %
ALGINATO DE SODIO al 0,7 %, (% de muestra adherida a la película de mucina - % de muestra adherida al plano sin mucina)/ % de muestra adherida al plano sin mucina	127 %
Etanol al 50 % (% de muestra adherida a la película de mucina - % de muestra adherida al plano sin mucina)/ % de muestra adherida al plano sin mucina	23 %

En este caso también, los resultados muestran evidentemente que el extracto objeto de la invención tiene propiedades mucoadhesivas y deslizantes similares a las de una sustancia mucoadhesiva conocida como alginato de sodio.

30



Ejemplo 4.

Ensayo de efecto de barrera

- 5 Para el ensayo de efecto de barrera, se usaron dos cámaras físicamente separadas por una membrana semipermeable (poros de 0,4  $\mu\text{m}$ ). Se sembraron fibroblastos humanos en la cámara inferior, mientras que el agente inflamatorio LPS (lipopolisacárido de *E. coli* purificado) se introdujo en la cámara superior; sobre la membrana semipermeable que separa las dos cámaras se estratificó una película fina de extracto de sen como se describe en la presente invención.
- 10 Se estimó la respuesta inflamatoria inducida a través de dosificación semicuantitativa de interleucina-6 (IL-6) liberada en el medio de cultivo en la cámara inferior: Se obtuvo la evaluación del efecto de barrera por comparación con el control positivo en que las dos cámaras estaban separadas por el mismo tipo de membrana semipermeable, sin embargo, sin ninguna barrera.
- 15 En cuanto al valor umbral por encima del que puede decirse que una sustancia causa un efecto de barrera en el ensayo presentado en este documento, se identificó un valor igual a un 15 % de la inhibición en comparación con el control por los autores de la presente invención, durante la configuración del ensayo, basándose en los ensayos realizados sobre sustancias que se sabe que tienen un efecto de barrera.
- 20 Después, se evaluó el efecto de barrera del extracto como se describe en este documento.
- Los datos presentados a continuación muestran que el extracto tiene un notable efecto de barrera.
- 25 El ensayo de evaluación se realizó de la siguiente manera a través de un método desarrollado para simular *in vitro* la acción protectora de sustancias y formulaciones que, cuando se aplican a la piel y membranas mucosas *in vivo*, forman un efecto "aislante" contra agentes ambientales.
- 30 El modelo aprovecha el principio por el que las células sometidas a contacto con un agente inflamatorio producen y secretan mediadores proinflamatorios (citocinas) en el entorno extracelular en una cantidad relacionada con el grado de inflamación causado. Cuanto mayor sea la cantidad de agente inflamatorio que llegue a las células, mayor será la cantidad de citocinas liberadas.
- 35 El modelo contempla la disposición de dos cámara físicamente separadas por una membrana semipermeable que permite el pase del solutos de tamaño suficientemente pequeño.
- En la cámara inferior, que consiste en una placa que contiene pocillos para cultivos celulares, se cultivan células HuDe (n.º BS PRC 41), mientras que la cámara superior, que consiste en un inserto para cultivos celulares complejos (transpocillos), aloja el agente inflamatorio.
- 40 Sobre la superficie de la membrana semipermeable del inserto que separa las dos cámaras, antes de la introducción del agente inflamatorio en la cámara superior, se estratifica una película fina de la muestra que se está examinando para evaluar cualquier BE sobre el pase libre del agente inflamatorio.
- 45 Como función de las capacidades aislantes de la muestra, habrá una disminución de la migración del agente inflamatorio desde la cámara superior y, como consecuencia, una estimulación inferior de las células para producir citocinas. El grado de la reacción inflamatoria se estima a través de la dosificación semicuantitativa de citocinas liberadas en el medio de cultivo en la cámara inferior, en particular, de interleucina 6 (IL-6).
- 50 Como control, se usa un experimento similar en que no se estratifica muestra sobre la membrana, haciendo posible de este modo la medición del efecto del agente inflamatorio sin ninguna barrera en adición a la membrana semipermeable.
- Además, se usa un control interno en que las células cultivadas se pretratan con la sustancia adaptada para inducir la liberación del marcador y la muestra se coloca sobre la membrana semipermeable en ausencia de dicha sustancia, de este modo, se llevan a cabo una o más mediciones a tiempo de la cantidad de marcador en el medio de cultivo de dicho control interno. En el control interno, las células, por lo tanto, se estimulan en primer lugar con la sustancia inductora y después tiene que evaluarse si la muestra que puede pasar la membrana e ir hacia la células empujada por el medio anterior tiene algún efecto en la disminución de la liberación del marcador no relacionado con el efecto de barrera. Por ejemplo, cuando un agente inflamatorio se usa como sustancia inductora, el control interno hace posible entender si la reducción en la concentración de citocinas en el medio de cultivo se debe al efecto de barrera o si la muestra que puede pasar hacia las células empujada por el medio anterior tiene algún efecto en la reducción de la respuesta inflamatoria independientemente del efecto de barrera.
- 60

El efecto de barrera (BE) se expresa como un porcentaje de la reducción de la liberación de IL-6 y se calcula a través de la comparación con el control positivo en que las dos cámaras están separadas por el mismo tiempo de membrana semipermeable sin la barrera creada por la muestra.

5 4.1 PREPARACIÓN DEL CULTIVO CELULAR:

Para cada muestra ensayada, se sembraron células de la línea celular HuDe en los pocillos de una placa de cultivo celular, una para el ensayo de barrera (BA) y otra para el control interno a una densidad de 40 000 células/ml en medio MEM enriquecido con suero bovino (FBS) al 10 %; 1 ml de suspensión celular por pocillo.

10 Las células se tratan con la MUESTRA (CAM), con el CONTROL POSITIVO (C+) (agente inflamatorio sin muestra) y con el CONTROL NEGATIVO (C) (medio únicamente) y cada ensayo se realiza por triplicado.

15 Las placas se incubaron a 37 °C, durante una noche (22-24 horas).

4.2 PREPARACIÓN DE INSERTOS PARA CULTIVOS CELULARES COMPLEJOS

20 Se colocan insertos para cultivos celulares complejos (Becton Dickinson) sobre otras placas y en cada una de ellas se suministra una cantidad fija de colágeno de 0,1 ml/ml). Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche (22-24 horas).

DÍA 2

25 4.3 VERIFICACIÓN DEL ESTADO Y NIVEL DE CONFLUENCIA CELULAR

Para continuar con el experimento, se requiere una confluencia no inferior al 95 %.

4.4 SECADO DE LA CAPA DE COLÁGENO

30 De las dos placas (BA e IC) con los insertos se retira el colágeno y se deja el inserto bajo el flujo de la campana durante el tiempo necesario para permitirle secarse completamente (10-15 minutos).

4.5 ENSAYO DE BARRERA (BA)

35 Las etapas descritas a continuación se realizan en la placa de cultivo para el BA

Configuración de la capa de muestra en el BA:

40 En la membrana semipermeable de la muestra se inoculan 100 µl de una composición basada en alginato al 0,5 % y se deja estratificar durante 20 minutos mientras que en los insertos C+ y C- no se añade nada. Una vez han pasado los 20 minutos, se elimina el exceso de muestra y se lavan las membranas con PBS de acuerdo con procedimientos especificados por el protocolo.

45 Adición de LPS (agente inflamatorio) a insertos de BA

Una vez se ha secado la capa de la muestra, en los tres primeros insertos CAM y en los tres C+, se inoculan 300 µl de LPS (lipopolisacárido de membrana) a la concentración de 1 µg/ml mientras que en los tres restantes C- se añaden 300 µl de medio MEM con FBS al 5 %. Los insertos se insertan en los respectivos pocillos con las células y se incuban las placas durante 1 hora a 37 °C y en una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub> al 5 % durante una noche.

50 Una vez completada la incubación de 1 hora, los insertos se eliminan y descartan y las placas se incuban de nuevo durante una noche (22-24 horas).

55 4.6 ENSAYO DE CONTROL INTERNO (IC):

El ensayo de control interno se realizó simultáneamente con el BT

Exposición de células IC a LPS:

60 Una vez secados, en los primeros seis insertos del IC, tres para la muestra a ensayar y tres para C+, se inoculan 300 µl de la solución de LPS mientras que se añaden en los tres restantes de los C- 300 µl del medio.

Los insertos con LPS y MEM entonces se insertan a continuación en los pocillos con células de IC y se incuban todos durante 1 h.

65

Retirada de LPS y secado de la membrana IC:

Una vez completada la incubación de 1 hora, los insertos se retiran de los pocillos con las células y se transfieren a la placa vacía mientras que la placa con las células se coloca en una incubadora.

La solución de LPS aún presente se retira de los insertos, estos últimos se someten a un rápido lavado con agua estéril ultrapura y se dejan secar.

Disposición de la capa de muestra en el IC:

En la membrana semipermeable de los tres insertos para la muestra se inoculan 100 µl de una composición basada en alginato al 0,5 % y se deja estratificar durante 20 minutos mientras que en los insertos C+ y C- no se añade nada. Una vez han pasado los 20 minutos se elimina el exceso de muestra y se lavan las membranas con PBS de acuerdo con procedimientos especificados por el protocolo.

Adición de LPS a insertos de IC

Una vez están listos los insertos con la muestra, se añaden 300 µl de medio a todos los insertos (CAM, C+, C-). Los insertos se insertan en sus pocillos respectivos con las células y las placas se incuban durante 1 h a 37 °C.

Una vez completada la incubación de 1 hora, los insertos se eliminan y descartan y las placas se incuban de nuevo durante una noche (22-24 horas).

DÍA 3

4.7 RECOGIDA DE SOBRENADANTE E INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO

Una vez han pasado las 22-24 horas, los sobrenadantes se recogen del BA y de las placas IC para realizar el ensayo ELISA y la dosificación semicuantitativa de IL-6.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BARRERA (BE)

El BE de una sustancia o compuesto se expresa como % de reducción en la liberación de citocina IL-6 por células expuestas a LPS, donde la muestra se ha ensayado respecto al control positivo (C+), donde las células únicamente se han expuesto a LPS.

$$BE = \% \text{ de reducción en la liberación de citocina IL-6} = 100 - \left[ \frac{\text{pg}/\mu\text{l de citocinas liberadas por muestra}}{\text{pg}/\mu\text{l de citocinas liberadas de C+}} \times 100 \right]$$

La tabla 1, presentada a continuación, muestra que el extracto de sen obtenido de acuerdo con la presente invención crea una barrera al pase de LPS.

MUESTRA	% DE INHIBICIÓN DE IL-6
Control interno	0
SEN, EXTRACTO REDUCIDO EN RESINAS Y SENÓSIDOS DE ACUERDO CON LA PRESENTE INVENCION	47
SEN, EXTRACTO RESINOSO REDUCIDO EN SENÓSIDOS DE ACUERDO CON LA PRESENTE INVENCION	60

Como puede observarse de los resultados anteriores, el extracto reducido en senósidos y resinas tiene excelentes propiedades mucoadhesivas y un alto efecto de barrera; el extracto resinoso reducido en senósidos, aunque tiene propiedades mucoadhesivas sorprendentemente reducidas, tiene un efecto de barrera muy elevado.

Por tanto, evidentemente ambos extractos son adecuados para los usos descritos y las reivindicaciones, así como mezclas de los dos hacen posible aumentar el efecto de barrera manteniendo altas propiedades mucoadhesivas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un extracto de *Cassia acutifolia* y/o *Cassia angustifolia* reducido en senósidos totales, en el que dichos senósidos totales tienen una concentración en porcentaje ponderal de  $\leq 0,5$  %.
2. El extracto de acuerdo con la reivindicación 1 reducido además en resinas.
- 10 3. El extracto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento o protección de piel o membranas mucosas parcialmente comprometidas.
4. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha membrana mucosa es la mucosa oral, la mucosa gástrica, la mucosa intestinal, la mucosa nasal, la mucosa vaginal, la mucosa uterina, la mucosa rectal.
- 15 5. Un proceso para la preparación de un extracto de *Cassia acutifolia* y/o *Cassia angustifolia*, que comprende las etapas de:
- 20 a. preparar un extracto hidroalcohólico de hojas y/o vainas de *Cassia acutifolia* y/o *Cassia angustifolia*, en el que dicho extracto hidroalcohólico se prepara sometiendo hojas y/o vainas de *Cassia acutifolia* y/o *Cassia angustifolia*, opcionalmente fragmentadas, a dos o más etapas de extracción en etanol en concentración decreciente
- b. obtener del extracto preparado en a. un extracto alcohólico aclarado y un extracto resinoso
- c. concentrar dicho extracto alcohólico por decantación y/o centrifugación y/o filtración, recoger el sobrenadante o el filtrado
- 25 d. dicho sobrenadante o filtrado de c. se somete a una o más etapas de ultrafiltración por las que se recoge el permeado y dicho permeado comprende senósidos totales a una concentración en porcentaje ponderal de  $\leq 50,5$  % y en el que dicha una o más etapas de ultrafiltración se realizan en una membrana semipermeable con un punto de corte de aproximadamente 500-15 000 dalton y/o
- 30 dicho filtrado o sobrenadante obtenido en la etapa c. o dicho permeado obtenido después de ultrafiltración se somete a una o más etapas a través de una resina de adsorción de alta porosidad y se recoge el eluido en el que dicho eluido así obtenido comprende senósidos totales a una concentración en porcentaje ponderal de  $\leq 0,5$ .
- 35 6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el extracto resinoso obtenido en b. y el extracto reducido en senósidos obtenido en d. se mezclan.
7. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en el que dicha concentración decreciente de etanol en la etapa a. varía de aproximadamente un 96 % de etanol a aproximadamente un 0 % de etanol.
- 40 8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que dichas dos o más etapas en a. comprenden una etapa en aproximadamente un 85 % de etanol, una etapa en aproximadamente un 50 % de etanol y una etapa en aproximadamente un 20 % de etanol.
- 45 9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8 que comprende además una etapa en aproximadamente un 5 % de etanol.
10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que dicha filtración en c. se realiza con un filtro con una porosidad de aproximadamente 25 micrómetros.
- 50 11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que dicho pase a través de resina se realiza sobre una resina de adsorción de alta porosidad de copolímero de estireno y DVB.
12. Una composición que comprende el extracto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
- 55 13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento o protección de piel o membranas mucosas parcialmente comprometidas.
- 60 14. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dicha membrana mucosa es la mucosa oral, la mucosa gástrica, la mucosa intestinal, la mucosa nasal, la mucosa vaginal, la mucosa uterina, la mucosa rectal.
- 65 15. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, que comprende además sustancias de origen natural y/o vegetal que tienen propiedades emolientes, digestivas, procinéticas, colagógicas, carminativas, probióticas, relajantes, excipientes, conservantes, humectantes.

16. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 en forma de cápsula, comprimido, gragea, gránulo, polvo, jarabe, elixir, gelatina dura, gelatina blanda, suspensión, emulsión, solución, supositorio, crema, gel, pulverización, ungüento, pomada, pasta, emulsión de grasa en agua, emulsión de agua en grasa, emulsión de grasa en gel, emulsión de gel en grasa.

5

17. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en la que dicha composición es una composición farmacéutica, está comprendida en un dispositivo médico o está comprendida en un alimento médico.

10

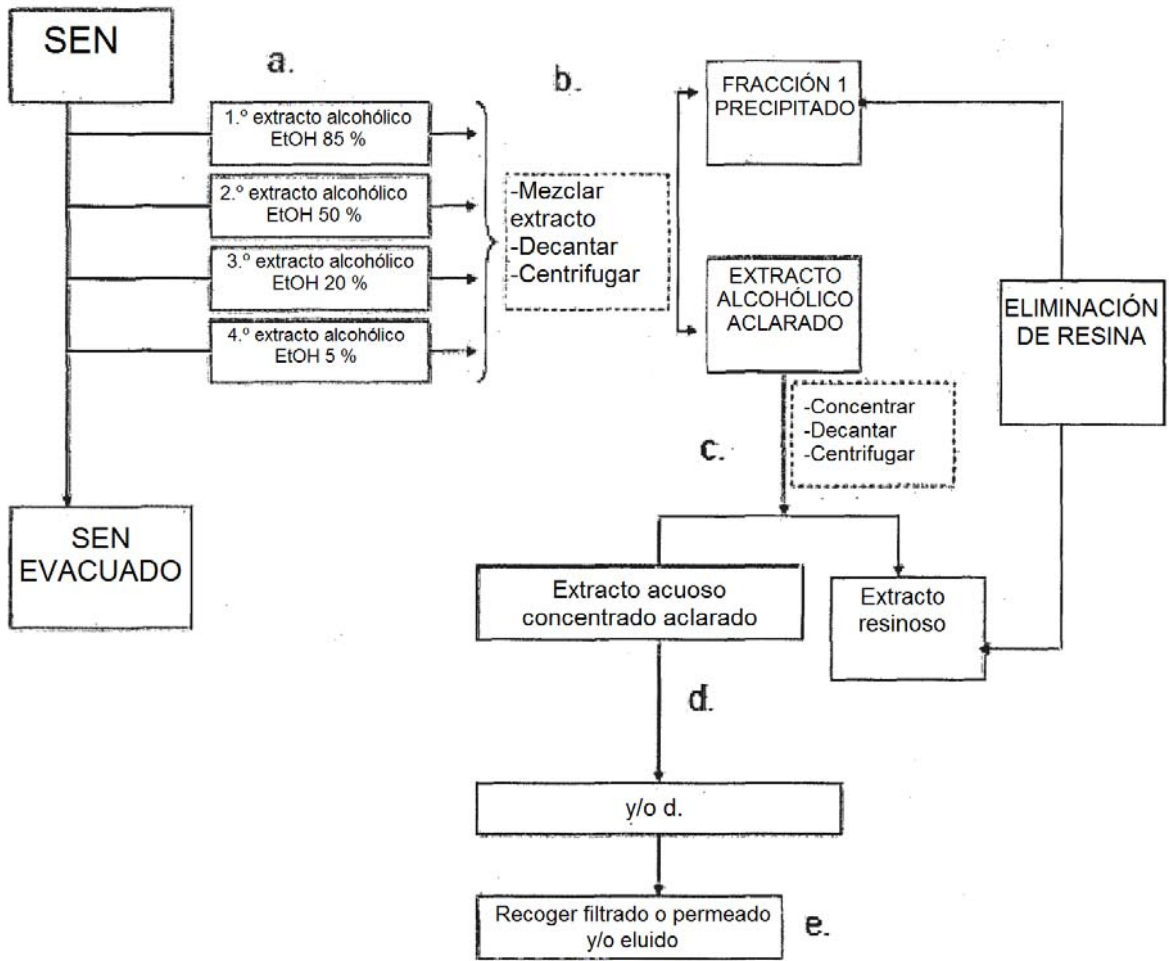


Fig. 1

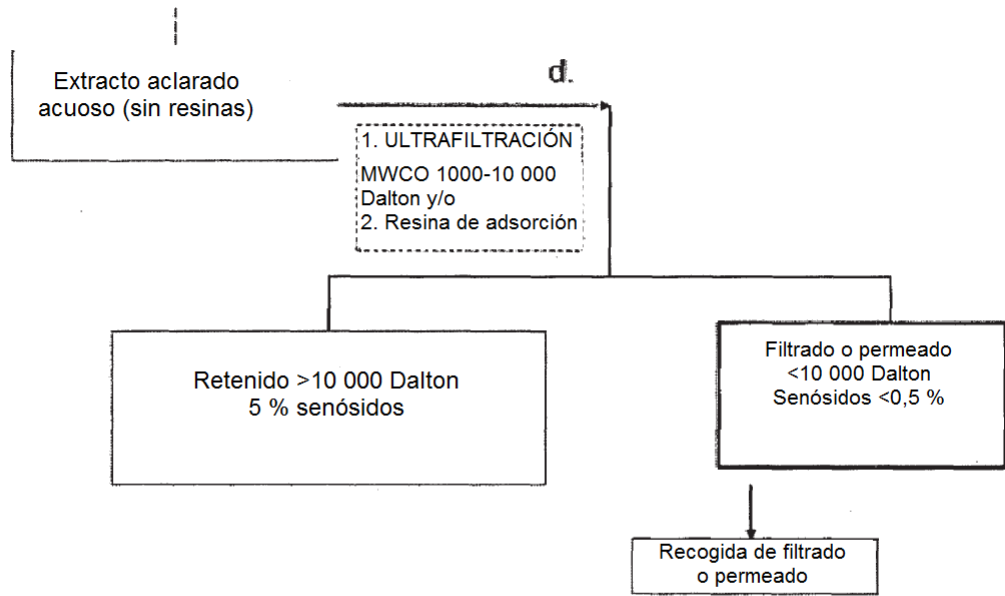


Fig. 2A

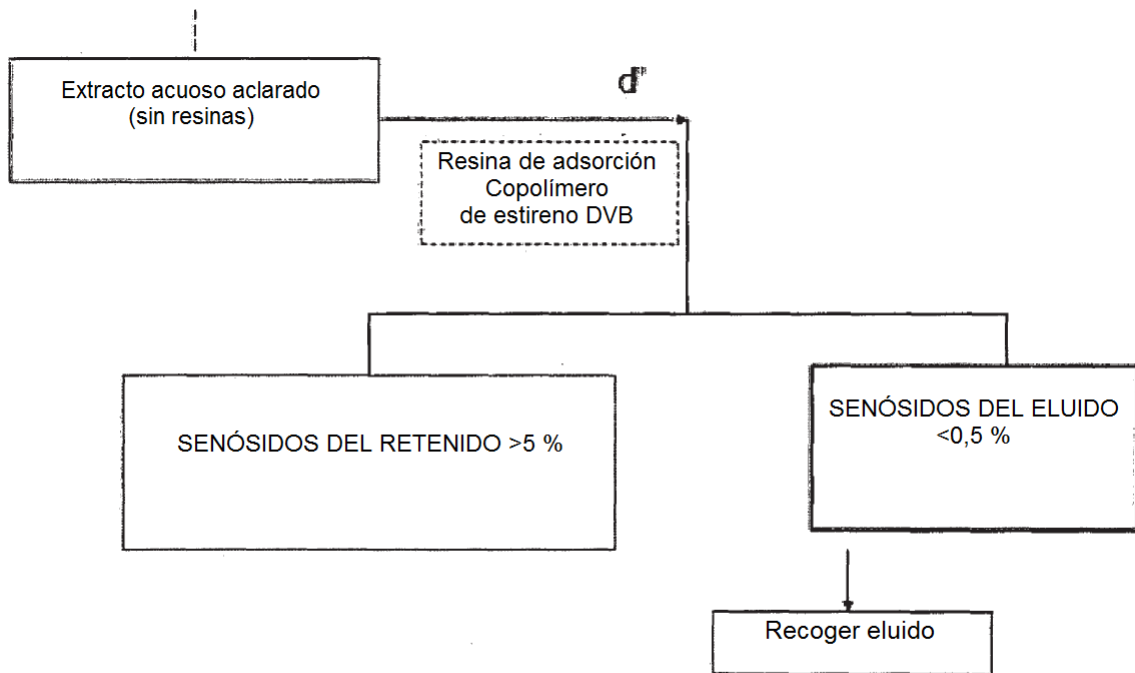


Fig. 2B

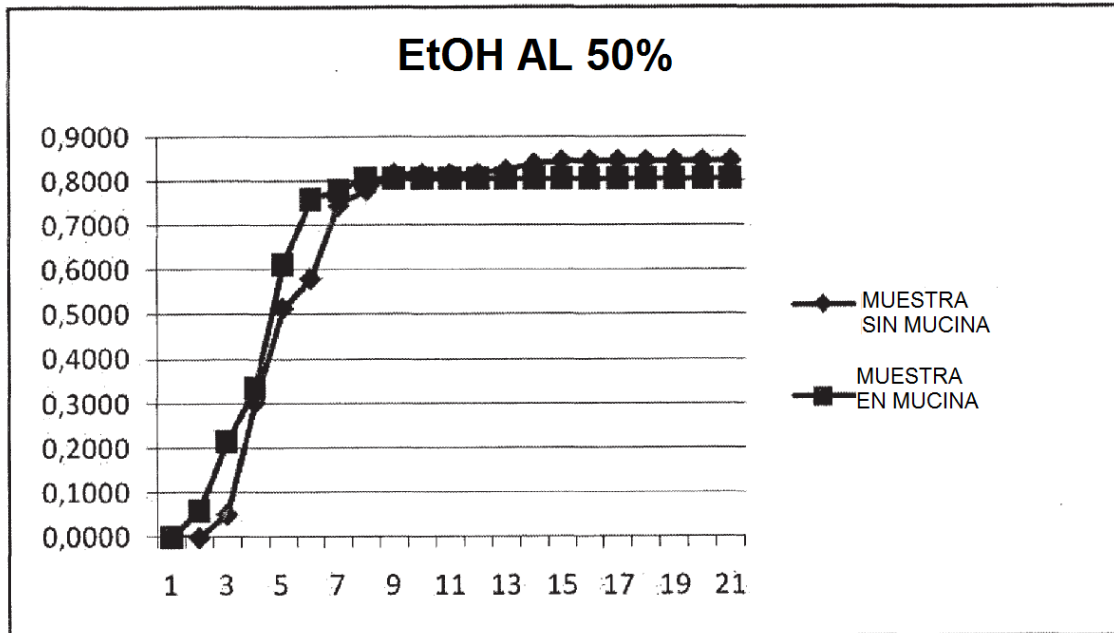


Fig. 3A

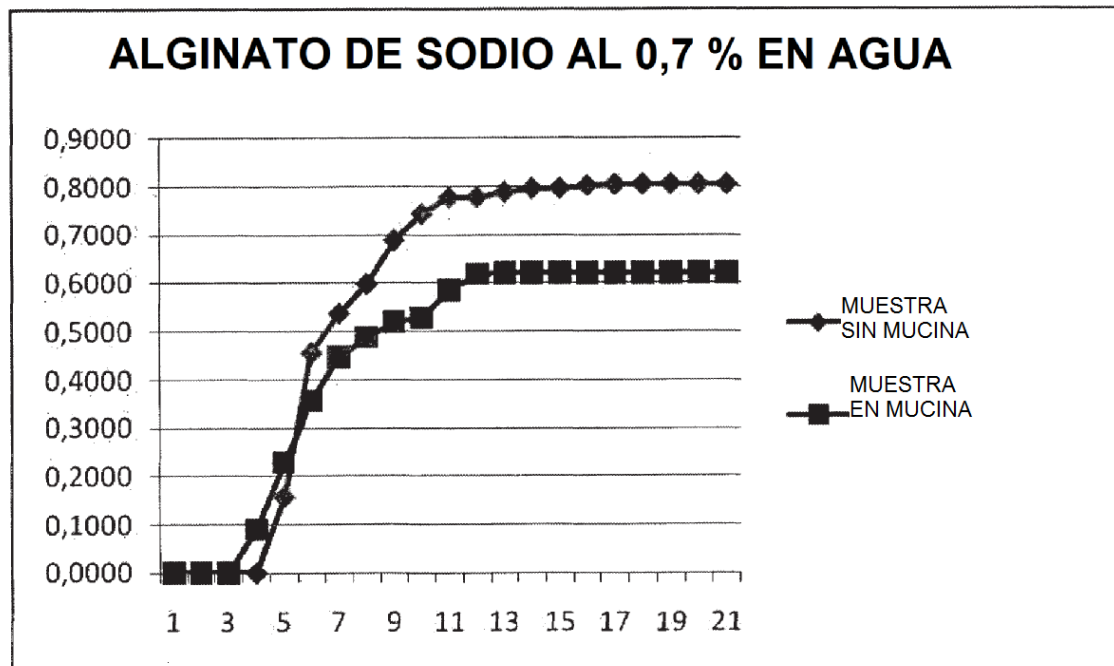


Fig 3B



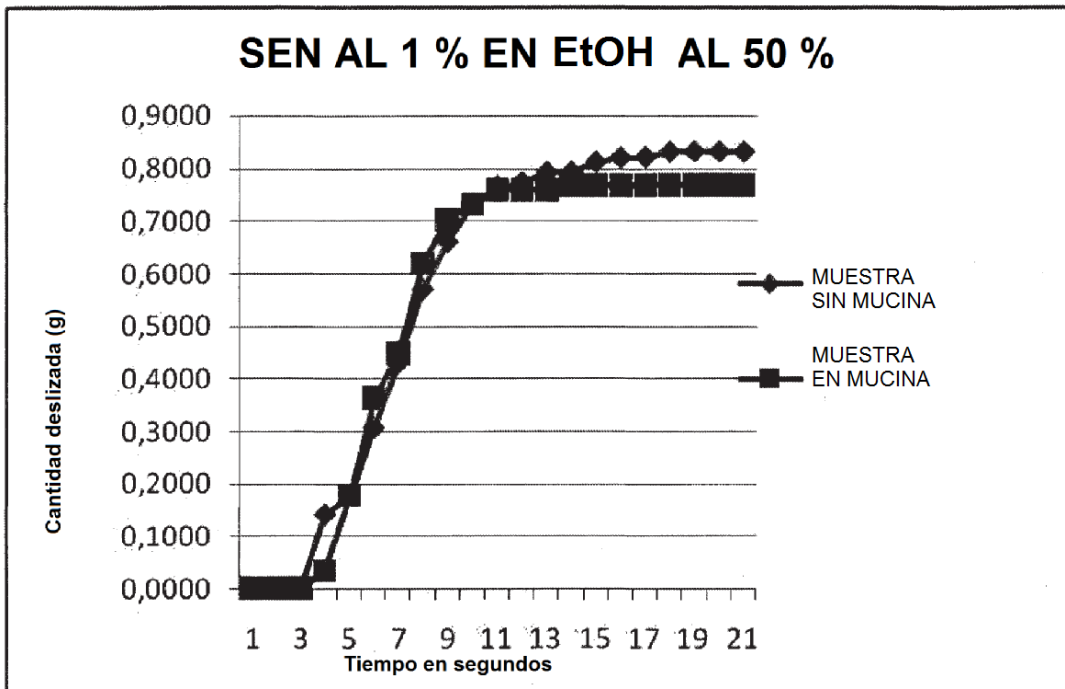


Fig 3C

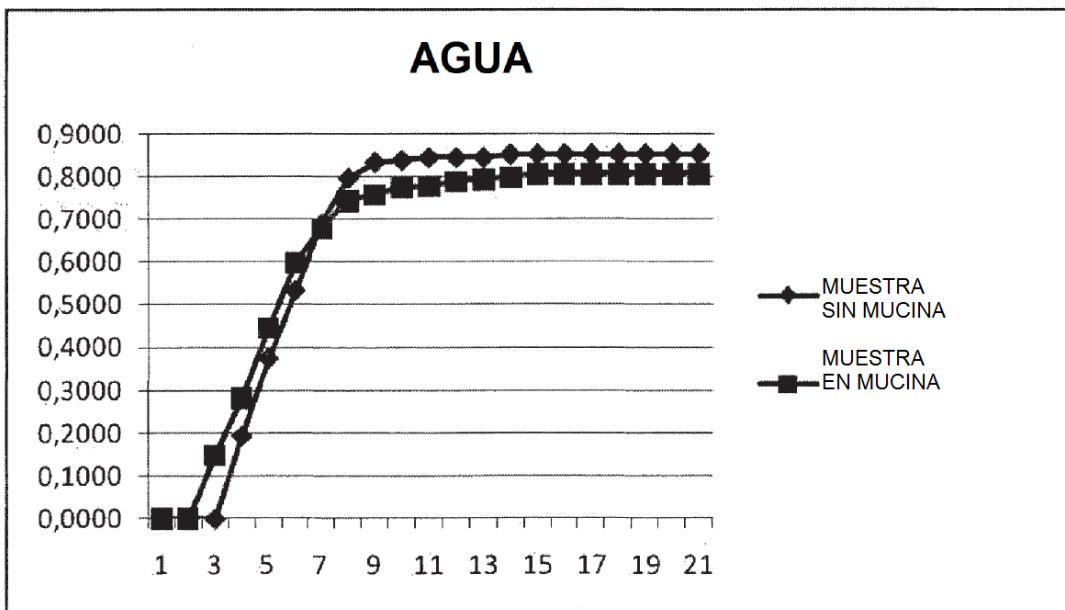


Fig 3D