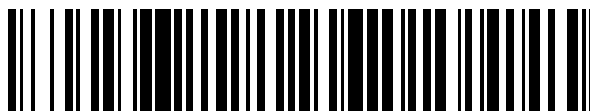


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 559**

51 Int. Cl.:

A61K 36/22 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2011 PCT/IL2011/000724**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12032523**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2011 E 11823157 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2613777**

54 Título: **Composiciones que comprenden extractos ácidos de almáciga**

30 Prioridad:

07.09.2010 US 380339 P

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

25.11.2019

73 Titular/es:

**REGENERA PHARMA LTD. (100.0%)
8 Menachem Plaut Street Tamar Park
76326 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**HAZAN, ZADIK y
LUCASSEN, ANDRE C., B.**

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 732 559 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

Composiciones que comprenden extractos ácidos de almáciga

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a composiciones de fracciones ácidas aisladas de almáciga para uso en el tratamiento de la apoplejía.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

La patente griega n.º GR 1.003.541 divulga la acción antimicrobiana y antifúngica del aceite de mástique de Quíos extraído de las hojas, las ramas y el fruto de *Pistacia lentiscus* var. Chia.

La patente griega n.º GR 1.003.868 divulga el uso de un producto derivado de *Pistacia lentiscus* var. Chia como antioxidante, como inductor de la cicatrización y como agente citostático.

La publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005/0238740 se refiere al uso de mástique y sus componentes para el control de infecciones microbianas.

Paraschos *et al.* (2007), que incluyó a algunos de los autores de la solicitud de patente mencionada anteriormente, divulgan la preparación de un extracto de mástique total sin polímero (TMEWP), preparado por extracción con disolvente polar de mástique bruto y la eliminación del polímero insoluble poli-β-mirceno del mismo, y separación de las fracciones ácidas y neutras de TMEWP (Paraschos *et al.* (2007) Antimicrob Agents Chemother 51(2):551-559). De acuerdo con la divulgación, la administración de TMEWP a ratones infectados por *H. pylori* durante un período de 3 meses dio como resultado una reducción en 30 veces de la colonización bacteriana, atribuible en gran parte a un compuesto particular purificado de la fracción ácida. Los autores indican que el TMEWP se preparó ya que se especuló que el alto porcentaje de poli-β-mirceno en las preparaciones de mástique crudas, como se usó en estudios previos, dificultaba la actividad *in vivo* potencial durante la administración oral. Los autores divulgan además que la retirada del poli-β-mirceno puede producir un resto terapéutico potenciado con actividad contra *H. pylori*.

La solicitud de patente EP n.º 1520585 se refiere al tratamiento del cáncer usando productos naturales de plantas o aceites esenciales o componentes de algunas especies de *Pistacia*.

La publicación de policitud de patente internacional n.º WO 2005/112967 se refiere a la actividad antineoplásica de la almáciga de Quíos.

Van der Berg *et al.* (1998) divulgan el aislamiento y la purificación de la fracción polimérica del mástique usando cromatografía de extracción y de exclusión por tamaño (Van der Berg *et al.* (1998) Tetrahedron Lett 3:2645-2648).

Barra *et al.* (2007) divulgó la extracción y el análisis por cromatografía de gases de aceite esencial de *P. lentiscus* L. (Barra *et al.* (2007) J Agric Food Chem 55(17):7093-7098). De acuerdo con la divulgación, se identificaron un total de 45 compuestos, incluyendo β-mirceno como uno de los compuestos principales.

La publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2010/100650 a algunos de los autores de la presente invención se refiere a usos terapéuticos de las fracciones de almáciga.

La publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2010/100651 a algunos de los autores de la presente invención divulga una composición que comprende una fracción aislada de almáciga obtenida extrayendo almáciga de *P. lentiscus* con etanol, recuperando el sobrenadante, evaporando el etanol, disolviendo el residuo con hexano, recuperando el sobrenadante y evaporando hexano, obteniendo la composición final a la que se añade una cera o aceite. La fracción obtenida comprende poli-beta-mirceno. Se divulga el tratamiento de, entre otros, la enfermedad de Alzheimer, la ELA y la enfermedad de Parkinson.

La publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2005/094837 se refiere al uso de ácido masticadienoico como inhibidor de la ADN polimerasa beta, usado para tratar cánceres, tumores y enfermedades neurodegenerativas.

5 Marner *et al.* (1991) divulgan la identificación de diversos triterpenoides de almáciga de *P. lentiscus* (Marner *et al.* (1991) *Phytochemistry*, 30, 3709-3712).

Giner-Larza *et al.* (2002) divulgan triterpenos antiinflamatorios procedentes de agallas de *Pistacia terebinthus* (*Planta Med* (2002), 68, 311-315).

No obstante, sigue existiendo una necesidad no cubierta de agentes seguros, versátiles y eficaces para el tratamiento de la apoplejía.

10 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de una fracción ácida aislada de almáciga y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de la apoplejía; en la que la fracción ácida aislada se obtiene de una fracción aislada de almáciga que es soluble en al menos un disolvente orgánico polar y soluble en al menos un disolvente orgánico no polar mediante una extracción ácido-base, separando de este modo la fracción ácida aislada de la fracción no ácida de la fracción aislada de almáciga que es soluble en al menos un disolvente orgánico polar y uno orgánico no polar, y en la que dicha fracción ácida aislada está sustancialmente desprovista de compuestos que son solubles en dicho disolvente orgánico polar pero insolubles en dicho disolvente orgánico no polar, y en la que la almáciga se deriva de una planta del género *Pistacia*.

20 La composición puede incluir una pluralidad de compuestos aislados seleccionados de los compuestos ácidos individuales encontrados en la fracción ácida de almáciga de acuerdo con la invención. La composición puede incluir al menos tres compuestos aislados seleccionados de ácido masticadienoico, ácido isomasticadienoico, ácido masticadienólico, ácido isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil masticadienólico, ácido 3-O-acetil epimasticadienólico, ácido 3-O-acetil isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil epi-isomasticadienólico, ácido oleanónico, ácido morónico y ácido 3-oxo-lup-20(29)-en-28-oico. En algunos modos de realización ejemplares, la composición incluye ácido masticadienoico, ácido isomasticadienoico y ácido oleanónico. Dicha composición presenta inesperadamente un efecto sinérgico, por lo que la combinación de compuestos presenta un efecto terapéutico notablemente mejorado en el tratamiento de la apoplejía, en comparación con los compuestos individuales solos.

30 La fracción ácida del mástique se puede distinguir de las fracciones de mástique divulgadas en la técnica anterior, ya que su preparación implica el uso de un disolvente polar y un disolvente no polar, mientras que la técnica anterior enseña el uso de disolventes polares solo. Las fracciones ácidas preparadas usando solo disolventes polares contienen compuestos que no son solubles en disolventes apolares tales como el hexano, mientras que estos compuestos no están presentes en la fracción ácida. En consecuencia, las fracciones divulgadas en el presente documento comprenden una combinación de compuestos que difiere de la divulgada en la técnica anterior. Además, los autores de la presente invención han descubierto que la fracción ácida posee inesperadamente un intervalo de actividades terapéuticas altamente inesperadas que no se sugieren en la técnica anterior.

40 Las enseñanzas de la presente invención se han ejemplificado con extractos de almáciga preparados mediante un procedimiento de extracción de tres etapas, para obtener una fracción ácida que es soluble tanto en un disolvente polar como en un disolvente no polar, y en el que se elimina el material de la almáciga que es soluble en el disolvente polar pero permanece insoluble en el disolvente no polar. Se han aislados e identificado los principales compuestos de la fracción ácida aislada. Diversas combinaciones de algunos de estos compuestos presentan un efecto sinérgico inesperado en el tratamiento de la apoplejía.

45 Sin desear estar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción particular, la actividad de las fracciones ácidas aisladas de la almáciga divulgadas en el presente documento hace que la presente invención sea útil para diversas enfermedades o afecciones asociadas con afecciones de deterioro neuronal. Se muestra que la actividad de las fracciones ácidas aisladas de almáciga se puede usar para el tratamiento de la apoplejía.

50 Se debe entender además que la actividad biológica de las fracciones y composiciones divulgadas en el presente documento se inhibe por la presencia de determinados compuestos que están presentes en las fracciones ácidas que se han preparado sin aplicar las dos primeras etapas de extracción como se divulgan en el presente documento.

En consecuencia, la presente invención proporciona una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la apoplejía.

55 En algunos modos de realización, la fracción ácida aislada en la composición para su uso de la reivindicación 1 se obtiene mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- (a) tratar la almáciga con un disolvente orgánico polar;
- (b) aislar una fracción soluble en dicho disolvente orgánico polar;
- (c) opcionalmente retirar dicho disolvente orgánico polar;
- (d) tratar la fracción soluble obtenida en la etapa (b) o (c) con un disolvente orgánico no polar,
- 5 (e) aislar una fracción soluble en dicho disolvente orgánico no polar;
- (f) opcionalmente, retirar dicho disolvente orgánico no polar;
- (g) disolver la fracción obtenida en la etapa (f) en un disolvente orgánico;
- (h) tratar la solución obtenida en la etapa (g) con una solución básica para obtener una fracción básica; y
- (i) acidificar la fracción básica obtenida en la etapa (h) con una solución ácida;
- 10 (j) extraer la solución obtenida en la etapa (i) con un disolvente orgánico;
- (k) opcionalmente, poner en contacto la fracción orgánica obtenida en el etapa (j) con un agente de secado para retirar el agua restante;
- (l) retirar el disolvente orgánico y/o el exceso de ácido de la fracción obtenida en cualquiera de las etapas (i), (j) o (k); y
- 15 (m) disolver la fracción aislada obtenida en la etapa (1) en un vehículo.

En algunos modos de realización, las etapas (d) a (f) pueden preceder a las etapas (a) a (c).

El tratamiento con una solución básica (basificante) en la etapa (h) puede comprender extraer la solución obtenida en la etapa (g) con una o más soluciones acuosas básicas adecuadas; o poner en contacto la solución obtenida en la etapa (g) con una resina de intercambio iónico básica.

- 20 La etapa (h) puede comprender poner en contacto la solución obtenida en la etapa (g) con una resina de intercambio iónico básica, y, después de esto, retirar la resina de intercambio iónico básica por filtración. En estos modos de realización, la etapa (i) comprende tratar la resina de intercambio iónico básica con una solución ácida.

- 25 En algunos modos de realización, las etapas (a) a (c) se llevan a cabo antes de las etapas (d) a (f); o las etapas (d) a (f) se llevan a cabo antes de las etapas (a) a (c). En algunos modos de realización, (a) a (c) y/o las etapas (d) a (f) se repiten para una multiplicidad de ciclos.

Cualquiera de los etapas (c), (f) y (1) puede comprender retirar el disolvente por un medio seleccionado del grupo que consiste en evaporación rotatoria, aplicación de alto vacío y una combinación de los mismos.

- 30 La etapa (h) puede comprender extraer la solución obtenida en la etapa (g) con una solución acuosa básica y recoger la fracción orgánica obtenida de este modo. El procedimiento puede comprender además combinar la fracción orgánica obtenida de la etapa (h) con una fracción obtenida en cualquiera de las etapas (i), (j) o (k).

- 35 La fracción orgánica obtenida en la etapa (h) se puede combinar con una fracción obtenida en cualquiera de las etapas (i), (j) o (k) en una cantidad en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % hasta aproximadamente un 50 % de la fracción orgánica obtenida de la etapa (h). La cantidad también puede estar en el intervalo de un 0,5 a un 50 %; o un 2 a un 25 %; o un 0,1 a un 10 %.

Los disolventes orgánicos polares adecuados para su uso en la invención se pueden seleccionar de un alcohol, un éter, un éster, una amida, un aldehído, una cetona, un nitrilo y combinaciones de los mismos.

- 40 Los ejemplos específicos de disolventes orgánicos polares adecuados incluyen metanol, etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, sec-butanol, t-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, neopentanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2-metil-2-butanol, etilenglicol, éter monometílico de etilenglicol, éter dietílico, éter metilético, éter etilpropílico, éter metilpropílico, 1,2-dimetoxietano, tetrahidrofurano, dihidrofurano, furano, pirano, dihidropirano, tetrahidropirano, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetaldehído, formiato de metilo, formiato de etilo, propionato de etilo, propionato de metilo, diclorometano, cloroformo, dimetilformamida, acetamida, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, acetona, etil metil
- 45 cetona, dietilcetona, acetonitrilo, propionitrilo y combinaciones de los mismos.

En algunos modos de realización, el disolvente orgánico polar comprende etanol.

- Los disolventes orgánicos no polares adecuados para su uso en la invención se pueden seleccionar de hidrocarburos alifáticos acíclicos o cíclicos, saturados o insaturados e hidrocarburos aromáticos, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con uno o más halógenos, y combinaciones de los mismos. En algunos modos de realización, el disolvente orgánico no polar se selecciona de alcanos C5-C10, cicloalcanos C5-C10, hidrocarburos aromáticos C6-C14 y perfluoroalcanos C7-C14, y combinaciones de los mismos.
- El disolvente orgánico no polar se puede seleccionar de pentanos, hexanos, heptanos, octanos, nonanos, decanos, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, benceno, tolueno, xileno e isómeros y mezclas de los mismos.
- El alcano C5-C10 se puede seleccionar del grupo que consiste en pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, ciclohexano e isómeros y mezclas de los mismos.
- En algunos modos de realización, el disolvente orgánico no polar es hexano.
- El disolvente orgánico en la etapa (g) y en la etapa (j) se puede seleccionar independientemente del grupo que consiste en éteres dialquílicos, éteres alquilarílicos, éteres diarílicos, ésteres, cetonas, hidrocarburos halogenados, hidrocarburos aromáticos C5-C14, perfluoroalcanos C5-C14.
- El disolvente orgánico adecuado en la etapa (g) y en la etapa (j) puede ser el mismo o diferente.
- El disolvente orgánico puede comprender un éter dialquílico.
- El disolvente orgánico puede ser éter dietílico.
- En algunos modos de realización, el disolvente orgánico polar comprende etanol, el disolvente orgánico no polar comprende hexano y el disolvente orgánico comprende éter dietílico.
- La etapa (h) puede comprender basificar con una solución acuosa básica. La solución acuosa básica se puede preparar disolviendo una base inorgánica en agua.
- La base inorgánica se puede seleccionar del grupo que consiste en carbonato de sodio, hidróxido de sodio, carbonato de potasio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, bicarbonato de sodio, fosfato de sodio, hidróxido de litio, carbonato de litio y fosfato de potasio.
- La base inorgánica puede ser carbonato de sodio. La concentración del carbonato de sodio en agua puede estar en el intervalo de un 2 a un 20 % p/p, o en el intervalo de un 3 a un 15 % p/p, o aproximadamente un 5 % p/p.
- La base inorgánica puede ser hidróxido de sodio.
- La solución acuosa básica se puede preparar disolviendo en agua una base orgánica soluble en agua.
- La primera base inorgánica puede ser carbonato de sodio acuoso aproximadamente al 5 % p/p, seguido de hidróxido de sodio acuoso aproximadamente al 4 % p/p.
- La basificación en la etapa (h) puede comprender poner en contacto la solución obtenida en la etapa (g) con una resina de intercambio iónico básica. La resina de intercambio iónico básica puede comprender estireno divinilbenceno, copolímeros poliacrílicos o formofenólicos.
- La basificación de la solución se puede hacer a un pH por encima de aproximadamente 7, o a un intervalo de pH de 8-10, o a un intervalo de pH de 10-13, o a un pH de >13.
- La solución ácida en la etapa (i) puede comprender una solución acuosa ácida o una solución no acuosa ácida.
- La solución acuosa ácida en la etapa (i) se puede preparar disolviendo un ácido inorgánico en agua o diluyendo una solución de ácido mineral concentrada.
- La solución acuosa ácida puede ser una solución de ácido clorhídrico o ácido fosfórico.
- La solución acuosa ácida en la etapa (i) se puede preparar disolviendo un ácido orgánico en agua o diluyendo una solución de ácido mineral concentrada.
- La acidificación se puede realizar a un pH inferior a aproximadamente 7, o a un pH inferior a aproximadamente 6, o a un pH inferior a aproximadamente 5, o a un pH inferior a aproximadamente 4, o a un pH inferior a aproximadamente 3.
- La acidificación también se puede hacer a un pH en el intervalo de 1-3.
- La solución no acuosa ácida en la etapa (i) se puede preparar disolviendo un ácido orgánico en un disolvente orgánico no acuoso seleccionado de un alcohol, un éster, un éter, una amida o mezclas de los mismos. El disolvente no acuoso puede ser metanol o etanol o una mezcla de los mismos.

El ácido orgánico se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico y ácido paratoluensulfónico.

El agente de secado usado en la etapa (k) se puede seleccionar del grupo de sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de calcio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de potasio.

- 5 La composición puede estar sustancialmente desprovista de compuestos terpénicos que sean solubles en dicho disolvente orgánico polar e insolubles en dicho disolvente orgánico no polar.

10 La composición puede comprender de aproximadamente un 0,01 hasta aproximadamente un 25 % (p/p) de la fracción ácida aislada de almáciga, en base al peso total de la composición, o de aproximadamente un 0,01 hasta aproximadamente un 12 % (p/p) de la fracción ácida aislada de almáciga, en base al peso total de la composición.

La fracción ácida aislada puede comprender al menos uno de: ácido masticadienólico, ácido isomasticadienoico; ácido isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil masticadienólico, ácido 3-O-acetil epimasticadienólico, ácido 3-O-acetil isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil epi-isomasticadienólico, ácido oleanónico, ácido morónico; y ácido 3-oxo-lup-20(29)-en-28-oico.

- 15 La fracción ácida aislada puede comprender además al menos uno de: ácido oleanólico, ácido ursónico y ácido ursólico. La fracción ácida aislada puede estar sustancialmente desprovista de ácido masticadienoico, o puede estar sustancialmente desprovista de aceites esenciales, o puede comprender al menos un ácido terpenoico, o puede comprender al menos un ácido triterpenoico.

20 El al menos un ácido terpenoico puede comprender al menos un ácido triterpenoico. El al menos un ácido triterpenoico se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido masticadienólico, ácido isomasticadienoico; ácido isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil masticadienólico, ácido 3-O-acetil epimasticadienólico, ácido 3-O-acetil isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil epi-isomasticadienólico, ácido oleanónico, ácido morónico y ácido 3-oxo-lup-20(29)-en-28-oico, y una combinación de los mismos.

- 25 El al menos un ácido terpenoico puede estar en forma monomérica o en forma oligomérica. La forma oligomérica se puede seleccionar del grupo que consiste en un dímero, un trímero y una combinación de los mismos.

La forma oligomérica puede ser un dímero o un trímero.

El al menos un ácido triterpenoico puede estar en forma monomérica o en forma oligomérica. La forma oligomérica se puede seleccionar del grupo que consiste en un dímero, un trímero y una combinación de los mismos.

- 30 La forma oligomérica puede ser un dímero o un trímero.

La fracción ácida aislada puede comprender una combinación de ácidos triterpenoicos monoméricos y diméricos, o una combinación de ácidos triterpenoicos monoméricos, diméricos y triméricos.

35 La composición puede comprender al menos uno de: ácido masticadienólico, ácido isomasticadienoico; ácido isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil masticadienólico, ácido 3-O-acetil epimasticadienólico, ácido 3-O-acetil isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil epi-isomasticadienólico, ácido oleanónico, ácido morónico; y ácido 3-oxo-lup-20(29)-en-28-oico.

La composición puede comprender además al menos uno de: ácido oleanólico, ácido ursónico y ácido ursólico.

La composición puede comprender al menos un ácido terpenoico. Los ácidos terpenoicos son como se describen anteriormente en el presente documento.

- 40 La composición puede comprender al menos un ácido triterpenoico. Los ácidos triterpenoicos son como se describen anteriormente en el presente documento.

La composición puede estar sustancialmente desprovista de ácido masticadienoico.

La almáciga se deriva de *Pistacia*.

- 45 En algunos modos de realización, la especie de *Pistacia* se selecciona del grupo que consiste en *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *P. palestina*, *P. saportae*, *P. terebinthus*, *P. vera* y *P. integerrima*.

Preferentemente, la especie de *Pistacia* es *Pistacia lentiscus* L.

La fracción ácida aislada se puede derivar de un material vegetal seleccionado del grupo que consiste en resina, hojas, ramitas, raíces, flores, semillas, brotes, corteza, frutos secos y raíces.

La presencia combinada de ácido isomasticadienoico y ácido masticadienoico da como resultado un efecto potenciado/sinérgico con respecto a la eficacia de la composición en el tratamiento de la apoplejía cuando se compara con la eficacia de los compuestos individuales.

5 Bien uno del ácido isomasticadienoico y ácido masticadienoico se puede aislar de una fuente natural, tal como la almáciga, o puede ser el producto de una síntesis química.

La proporción entre el ácido isomasticadienoico y el ácido masticadienoico puede ser de aproximadamente 1:1 p/p.

10 De acuerdo con algunos modos de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que consiste esencialmente en ácido oleanónico, ácido isomasticadienoico y ácido masticadienoico como los únicos ingredientes farmacéuticamente activos; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presencia combinada de los tres compuestos da como resultado un claro efecto sinérgico con respecto a la eficacia de la composición en el tratamiento de la apoplejía cuando se compara con la eficacia de los compuestos individuales o una mezcla de solo dos de estos tres compuestos.

15 Cualquiera de ácido oleanónico, ácido isomasticadienoico y ácido masticadienoico se puede aislar bien de una fuente natural, tal como la almáciga, o puede ser el producto de una síntesis química.

La proporción entre el ácido isomasticadienoico y el ácido masticadienoico y el ácido oleanónico puede ser de aproximadamente 1:1:1 p/p/p.

20 El al menos un ácido triterpenoico puede ser un monómero. La composición puede comprender monómeros de ácido oleanónico y ácido morónico. Los monómeros de ácido oleanónico y ácido morónico son, en algunos casos, productos de reacciones de síntesis química.

El al menos un ácido triterpenoico puede comprender una forma oligomérica. La forma oligomérica se puede seleccionar del grupo que consiste en un dímero, un trímero y una combinación de los mismos. La forma oligomérica puede ser un dímero.

El al menos un ácido triterpenoico puede ser el producto de una síntesis química.

25 El al menos un ácido triterpenoico que comprende una forma oligomérica puede ser el producto de una síntesis química. El al menos un ácido triterpenoico puede ser una forma dimérica y es el producto de una síntesis química.

El al menos un ácido triterpenoico se puede derivar de una fuente natural, en particular una fuente vegetal.

30 La composición puede comprender una combinación de diferentes ácidos triterpenoicos, en la que al menos un ácido triterpenoico es el producto de una síntesis química y al menos otro ácido triterpenoico se deriva de una fuente vegetal.

Las fuentes naturales incluyen plantas clasificadas en la familia Anacardiaceae. Las plantas adecuadas incluyen aquellas clasificadas en un género seleccionado del grupo que consiste en *Pistacia*.

Las plantas adecuadas se seleccionan del género *Pistacia*.

35 En algunos modos de realización, la especie de *Pistacia* se selecciona del grupo que consiste en *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *P. palestina*, *P. saportae*, *P. terebinthus*, *P. vera* y *P. integerrima*.

Preferentemente, la especie de *Pistacia* es *Pistacia lentiscus* L.

La fuente natural puede ser un material vegetal seleccionado del grupo que consiste en resina, hojas, ramitas, raíces, flores, semillas, brotes, corteza, frutos secos y raíces.

40 En algunos modos de realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo hidrófobo. En algunos modos de realización, el vehículo hidrófobo comprende al menos un aceite. El aceite se puede seleccionar del grupo que consiste en un aceite mineral, un aceite vegetal y combinaciones de los mismos. En algunos modos de realización, el aceite se selecciona del grupo que consiste en aceite de semilla de algodón, aceite de oliva, aceite de almendra, aceite de canola, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de uva, 45 aceite de cacahuete, aceite de azafrán, aceite de sésamo, aceite de soja y combinaciones de los mismos. El aceite mineral puede ser aceite mineral ligero. En algunos modos de realización, el vehículo hidrófobo comprende al menos una cera. En algunos modos de realización, el vehículo hidrófobo comprende una combinación de al menos un aceite y al menos una cera.

50 Una composición de acuerdo con la invención puede estar en una forma adecuada para su administración por una ruta seleccionada del grupo que consiste en parenteral, transdérmica, oral y tópica.

Una composición de acuerdo con la invención también puede estar en una forma adecuada para su administración tópica.

Una composición de acuerdo con la invención puede estar de forma alternativa en una forma adecuada para su administración oral.

- 5 Una composición de acuerdo con la invención puede estar en una forma adecuada para su administración parenteral.

La composición también puede estar en una forma adecuada para su administración por inyección. La composición puede ser una formulación parenteral para su administración por una ruta seleccionada del grupo que consiste en subcutánea, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, intracerebral, 10 intracerebroventricular, intraósea e intratecal.

La composición es una formulación parenteral para su administración por vía subcutánea.

La composición se puede formular para su administración por una ruta seleccionada del grupo que consiste en dérmica, vaginal, rectal, inhalatoria, intranasal, ocular, auricular y bucal.

La composición puede estar en una forma adecuada para administración cosmética o dermatológica.

- 15 La composición farmacéutica puede estar en una forma seleccionada del grupo que consiste en una cápsula, un comprimido, un liposoma, un supositorio, una suspensión, una pomada, una crema, una loción, una solución, una emulsión, una película, un cemento, un polvo, un pegamento, un aerosol y un pulverizador. La cápsula se puede seleccionar del grupo que consiste en una cápsula de gelatina dura y una cápsula de gelatina blanda. La emulsión puede ser una nanoemulsión o una microemulsión.

- 20 La formulación puede comprender al menos uno de un complejo de inclusión, una nanoemulsión, una microemulsión, un polvo, una balsa lipídica, una micropartícula lipídica, un dendrímero y un liposoma. El complejo de inclusión puede comprender al menos una ciclodextrina. La al menos una ciclodextrina puede comprender hidroxipropil- β -ciclodextrina. La nanoemulsión puede comprender gotículas que tienen un tamaño de partícula promedio de menos de 800 nm, o menos de 500 nm, o menos de 200 nm. El polvo puede ser un polvo secado por pulverización. El liposoma puede comprender una vesícula multilamelar. La microemulsión puede 25 comprender un tensioactivo no iónico. El tensioactivo no iónico se puede seleccionar del grupo que consiste en un aceite de ricino polietoxilado, un éster de ácido graso de sorbitán de polioxietileno (polisorbatos), un poloxámero, un derivado de la vitamina E, un éter alquílico de polioxietileno, un estereato de polioxietileno o un glicerido poliglicolizado saturado o combinaciones de los mismos.

- 30 La composición se puede disponer en un artículo de fabricación en forma de un recubrimiento. El artículo de fabricación puede comprender un recipiente, en el que la composición se dispone dentro del recipiente. El artículo de fabricación se puede seleccionar del grupo que consiste en un artículo de tela, un pañal, un apósito para heridas, un dispositivo médico, una aguja o una pluralidad de agujas, una microaguja o una pluralidad de microagujas, un dispositivo de inyección y un distribuidor de pulverización. El artículo de fabricación puede 35 comprender una pluralidad de microagujas. El dispositivo médico se puede seleccionar del grupo que consiste en una prótesis, un órgano artificial o un componente del mismo, una válvula, un catéter, un tubo, una endoprótesis vascular, una membrana artificial, un marcapasos, un sensor, un endoscopio, un dispositivo de formación de imágenes, una bomba, un alambre y un implante. El implante se puede seleccionar del grupo que consiste en un implante cardíaco, un implante coclear, un implante corneal, un implante craneal, un implante dental, un implante maxilofacial, un implante de órgano, un implante ortopédico, un implante vascular, un implante intraarticular y un 40 implante mamario.

La composición puede ser adecuada para su administración por un medio seleccionado del grupo que consiste en electroporación, sonicación, radiofrecuencia, pulverización presurizada y combinaciones de los mismos.

- 45 La composición se usar para tratar el deterioro de la función neurológica. El deterioro de la función neurológica El deterioro de la función neurológica está asociado con una afección o enfermedad, y la afección es una apoplejía.

- La composición se puede usar para tratar heridas en la piel, incluyendo, por ejemplo, una úlcera venosa en la pierna, una úlcera por presión, una úlcera de pie diabético, una quemadura, una herida por amputación, una úlcera de decúbito (escara de decúbito), un injerto donante de piel de espesor parcial, un sitio donante de injerto de piel, un sitio de implantación de dispositivo médico, una herida por mordedura, una herida por congelación, 50 una herida por punción, una herida de metralla, una dermoabrasión, una contusión, una infección, una herida y una herida quirúrgica.

La composición también se puede usar para inducir o promover la reparación de tejidos. Como se usa en el presente documento, la reparación de tejidos engloba la inducción y promoción de la regeneración tisular, incluyendo de tejidos neurales.

La composición puede ser para inducir o promover la reparación de tejidos después de una lesión o traumatismo. La lesión o el traumatismo se puede seleccionar del grupo que consiste en un infarto de miocardio, una embolia pulmonar, un infarto cerebral, una enfermedad oclusiva de una arteria periférica, una hernia, un infarto esplénico, una úlcera venosa, una axotomía, un desprendimiento de retina, una infección y un procedimiento quirúrgico.

- 5 La composición también se puede usar para inducir o promover la extensión de la vida en animales. Los animales se pueden seleccionar del grupo de humanos, mamíferos no humanos, aves y peces.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención quedarán claros a partir de la siguiente descripción y dibujos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 La **figura 1** muestra un cromatograma de HPLC en fase inversa de una fracción ácida aislada de acuerdo con la invención. El cromatograma se obtuvo usando un detector UV-VIS en la detección de longitud de onda de 205 nm.

La **figura 2A** muestra un cromatograma de LC-MS de una fracción ácida aislada de acuerdo con la invención, indicativa de una mezcla de dímeros de ácido triterpenoico

- 15 La **figura 2B** muestra los espectros de masas de los picos principales del cromatograma de la figura 2A.

La **Figura 2C** muestra un espectro de masas ampliado del pico en el tiempo de retención de 6,09 min, mostrado en la figura 2A.

La **Figura 2D** muestra un espectro de masas ampliado del pico en el tiempo de retención de 6,17 min, mostrado en la figura 2A.

- 20 La **figura 3A** muestra un espectro de masas TOF de una fracción ácida aislada de almáciga, indicativa de una mezcla de ácidos triterpénicos monoméricos y diméricos.

La **figura 3B** es la lista de picos para la figura 3A.

- 25 La **figura 4** muestra el cromatograma preparativo de la fracción ácida aislada como se prepara de acuerdo con el ejemplo 1. La numeración de los picos corresponde a la numeración de los picos del cromatograma analítico de la figura 1.

La **figura 5A** muestra el espectro de ^1H -RMN del ácido morónico, aislado por HPLC preparativa a partir de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

La **figura 5B** muestra el espectro de ^{13}C -RMN del ácido morónico, aislado por HPLC preparativa a partir de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

- 30 La **figura 6A** muestra el espectro de ^1H -RMN del ácido oleanónico, aislado por HPLC preparativa a partir de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

La **figura 6B** muestra el espectro de ^{13}C -RMN del ácido oleanónico, aislado por HPLC preparativa a partir de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

- 35 La **figura 7A** muestra el espectro de ^1H -RMN del ácido masticadienoico, aislado por HPLC preparativa a partir de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

La **figura 7B** muestra el espectro de ^{13}C -RMN del ácido masticadienoico, aislado por HPLC preparativa a partir de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

La **figura 8A** muestra el espectro de ^1H -RMN del ácido isomasticadienoico, aislado por HPLC preparativa a partir de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

- 40 La **figura 8B** muestra el espectro de ^{13}C -RMN del ácido isomasticadienoico, aislado por HPLC preparativa a partir de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

La **figura 9A** muestra el espectro de ^1H -RMN del ácido 3-(O-acetil)-masticadienónico, aislado por HPLC preparativa a partir de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

- 45 La **figura 9C** muestra el espectro de ^{13}C -RMN del ácido 3-(O-acetil)-masticadienónico, aislado por HPLC preparativa a partir de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

La **figura 10A** muestra el espectro de ^1H -RMN del ácido 3-(O-acetil)-isopticoadadólico, aislado por HPLC preparativa a partir de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

La **figura 10b** muestra el espectro de ^{13}C -RMN del ácido 3-(O-acetil)-isopticoadadólico, aislado por HPLC preparativa a partir de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

La **figura 11A** muestra el efecto de la fracción ácida preparada de acuerdo con las enseñanzas del documento WO 2003/097212 en células ARPE-19.

- 5 La **figura 11B** muestra el efecto de la fracción ácida preparada de acuerdo con el ejemplo 2 de la presente invención en células ARPE-19.

La **figura 11C** muestra el efecto del vehículo de aceite de semilla de algodón en células ARPE-19.

La **figura 12A** muestra el efecto de la fracción insoluble en hexano aislada de la fracción ácida preparada de acuerdo con las enseñanzas del documento WO2003/097212 en células ARPE-19.

- 10 La **figura 12B** muestra el efecto de la solución etanólica al 1 % (p/p) de la fracción ácida aislada preparada de acuerdo con el ejemplo 1 de la presente invención en células ARPE-19.

La **figura 12C** muestra el efecto del vehículo de etanol en células ARPE-19.

- 15 Las **figuras 13A-C** muestran pictogramas de células tratadas con RPh-Ac (panel superior) o células no tratadas (vehículo, panel inferior) y teñidas con anticuerpos (Ab) contra: sinaptofisina (**figura 13A**); Akt fosforilado (pAkt^{Ser473}) (**figura 13B**); contra GSK3-beta^{Ser9} fosforilado (**figura 13C**).

La **figura 14A** muestra gráficos que representan los resultados del modelo de MCAO de rata con respecto al tiempo de retirada de la cinta adhesiva de la pata contralateral para diferentes composiciones de la presente invención.

- 20 La **figura 14B** muestra gráficos que representan el factor de multiplicación de referencia por las composiciones: ácido isomasticadienoico (IMDA), o una combinación de ácido isomasticadienoico y ácido masticadienoico (IMDA+MDA); o una combinación de ácido oleanónico, ácido isomasticadienoico y masticadienoico (OA+MDA+IMDA), en la retirada de la cinta adhesiva de la pata contralateral.

- 25 La **figura 15** muestra fotografías de ratas que demuestran el efecto del vehículo de semilla de algodón (panel izquierdo), RPh-Ac (panel central) y la combinación de OA+MDA+IMDA (panel derecho) en la cicatrización de heridas quirúrgicas en ratas del modelo de MCAO del ejemplo 5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 30 Los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que fracciones ácidas aisladas de la almáciga muestran una alta actividad para mejorar o revertir el deterioro de la función neurológica, la recuperación de la apoplejía, la cicatrización de heridas de la piel, promover la reparación de tejidos y promover la extensión de la vida en animales.

En el presente documento se divulga por primera vez que, debido a sus diversas actividades para estimular e inducir la regeneración celular, la fracción ácida aislada de la almáciga, así como combinaciones de compuestos aislados de la misma, como se describe en el presente documento, se pueden emplear como un ingrediente activo en una composición farmacéutica para una serie de indicaciones terapéuticas.

- 35 De forma ventajosa, las composiciones de la invención se pueden usar en procedimientos para tratar el deterioro de la función neurológica y afecciones de la piel. Al entrar en contacto con células de sujetos tanto humanos como no humanos, la composición induce la diferenciación celular en una amplia variedad de tejidos, compartimentos celulares y linajes celulares, incluyendo la piel, el endotelio, las membranas mucosas, los huesos, los tendones y el cartílago. Además, la actividad de diferenciación celular de la composición farmacéutica se puede explotar para promover la incorporación *in vivo* de dispositivos médicos, implantes y trasplantes de órganos. Además, la composición farmacéutica se puede usar para promover la extensión de la vida en animales.

Definiciones

- 45 Como se usa en el presente documento, los términos "mástique", "resina de mástique", "goma de lentisco" y "almáciga", se usan de manera intercambiable para referirse a una resina de árbol (también conocida como oleoresina) obtenida como un exudado de cualquier árbol clasificado en la familia Anacardiaceae. Árboles en el género *Pistacia*, especialmente *Pistacia lentiscus* L., y en particular el cultivar *P. lentiscus* L. cv. Chia (cultivada en la isla griega de Quíos), son conocidos por su alta producción de mástique. Otras variedades incluyen *P. lentiscus* L. var. *emarginata* Engl., y *P. lentiscus* L. var. *latifolia* coss. Especies adicionales de *Pistacia* incluyen, por ejemplo, *P. atlantica*, *P. palestina*, *P. saportae*, *P. terebinthus*, *P. vera* y *P. integerrima*.

Como se usa en el presente documento, el término "fracción ácida aislada de almáciga" se refiere a una fracción obtenida después de la extracción de goma de lentisco con al menos un disolvente orgánico polar y al menos

uno no polar, seguido de una extracción ácido-base de una solución del material así obtenido y el aislamiento de la fracción ácida resultante. La fracción ácida aislada es soluble en disolventes orgánicos tanto polares como no polares.

5 Como se usa en el presente documento, el término "pluralidad" se refiere a más de uno, preferentemente más de dos. Como se usa en el presente documento, el término "sinérgico" significa más que aditivo.

10 Como se usa en el presente documento, el término "extracción ácido-base" se refiere a un procedimiento en el que una solución de disolvente orgánico que contiene componentes orgánicos ácidos y no ácidos se trata/extrae con una o más soluciones acuosas básicas. Como resultado de esto, los componentes ácidos orgánicos se desprotonan y, por tanto, se convierten en sus correspondientes formas de sal iónica y, como resultado, se disolverán en dicha solución acuosa básica. Los componentes orgánicos no ácidos se quedarán en la solución orgánica original. Posteriormente, la solución acuosa básica que contiene las formas de sal de los componentes ácidos se acidifica, dando como resultado la reformación de las formas ácidas protonadas de los componentes ácidos orgánicos. Estas formas ácidas protonadas (fracción ácida) se pueden extraer de la solución acuosa acidificada de varias maneras dependiendo de las propiedades de los compuestos ácidos. Una opción para 15 extraer la fracción ácida de la solución acidificada es por extracción en un disolvente orgánico adecuado. El ejemplo 1 es un ejemplo no limitante de una extracción ácido-base como se describe anteriormente.

Dependiendo de la solubilidad de los compuestos ácidos en la solución acuosa acidificada, la fracción ácida se puede aislar por medio de filtración de la solución acuosa acidificada.

20 En lugar de usar una solución acuosa básica para la extracción ácido-base, también se pueden usar formas básicas de resinas de intercambio iónico. En estos casos, los componentes orgánicos ácidos (fracción ácida) se capturan en su forma aniónica desprotonada por la resina. La resina se retira posteriormente de la solución inicial, dejando atrás los componentes no ácidos. Los componentes ácidos (fracción ácida) se liberan posteriormente de la resina por tratamiento de la resina con una solución ácida adecuada.

25 El uso de resinas de intercambio iónico para extracciones ácido-base es especialmente adecuado para la ampliación del procedimiento y se puede usar para el desarrollo de procedimientos de extracción (semi)continuos.

Se pueden encontrar ejemplos de las extracciones ácido-base anteriores y otras variaciones en muchos manuales y otras publicaciones, y se consideran de conocimiento común de los expertos en la técnica. Un ejemplo de un manual útil es "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry", 5.^a edición, 1989, (p. 162-163).

30 Como se usa en el presente documento, el término "grado de pureza" se refiere al contenido de un compuesto químico especificado en una preparación, expresado como un porcentaje en peso por peso del compuesto químico especificado con respecto a otros compuestos químicos en la preparación.

35 Como se usa en el presente documento, "compuestos de terpeno" se refiere a hidrocarburos que contienen isopreno, que tienen unidades de isopreno ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$) en una orientación de cabeza a cola. Los hidrocarburos terpénicos en general tienen la fórmula molecular $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$, e incluyen hemiterpenos, (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40), que, respectivamente, tienen 1, 2, 3, 4, 6 y 8 unidades de isopreno. Los terpenos se pueden clasificar además como acíclicos o cíclicos.

40 Como se usa en el presente documento, "terpenoides" y "compuestos terpenoides" se refieren de manera intercambiable a compuestos relacionados con el terpeno que contienen oxígeno además de unidades de isopreno, y por tanto incluyen alcoholes, aldehídos y cetonas. Los terpenoides se subdividen de acuerdo con el número de átomos de carbono de manera similar al terpeno y, por tanto, incluyen hemiterpenoides, (C5), monoterpenoides (C10), sesquiterpenoides (C15), diterpenoides (C20), triterpenoides (C30) y tetraterpenoides (C40), que, respectivamente, tienen 1, 2, 3, 4, 6 y 8 unidades de isopreno. El esqueleto de los terpenoides puede 45 diferir de la estricta aditividad de las unidades de isopreno por la pérdida o desplazamiento de un fragmento, en general un grupo metilo. Los ejemplos de monoterpenoides incluyen alcanfor, eugenol y borneol. Los ejemplos de diterpenoides incluyen fitol y taxol. Los ejemplos de triterpenoides incluyen escualeno y lanosterol.

50 Como se usa en el presente documento, "ácidos terpenoicos" se refiere a compuestos terpenoides que contienen al menos un grupo ácido carboxílico. Los ácidos terpenoicos pueden contener adicionalmente uno o más otros grupos funcionales que contienen oxígeno que comprenden grupos hidroxilo, ceto, aldehído, éter (cíclico y no cíclico) y éster (cíclico y no cíclico).

55 Como se usa en el presente documento, "ácidos triterpenoicos" se refiere a compuestos triterpenoides que contienen al menos un grupo ácido carboxílico. Los ácidos triterpenoicos pueden contener adicionalmente uno o más otros grupos funcionales que contienen oxígeno que comprenden grupos hidroxilo, ceto, aldehído, éter (cíclico y no cíclico) y éster (cíclico y no cíclico).

Como se usa en el presente documento, "una forma oligomérica de un ácido terpenoico" se refiere a un ácido terpenoide oligomérico en el que las unidades monoméricas son del mismo ácido terpenoico o de diferentes ácidos terpenoicos, y están unidas en cualquier disposición posible, y están conectadas entre sí a través de cualquier posible enlace o grupo funcional, tal como un enlace C-C, un grupo éster o un grupo éter.

- 5 Como se usa en el presente documento, "una forma oligomérica de un ácido triterpenoico" se refiere a un ácido triterpenoico oligomérico en el que las unidades monoméricas son del mismo ácido triterpenoico o de diferentes ácidos triterpenoicos, y están unidas en cualquier disposición posible, y están conectadas entre sí a través de cualquier posible enlace o grupo funcional, tal como un enlace C-C, un grupo éster o un grupo éter.

- 10 Como se usa en el presente documento, los términos "ácido masticadienoico", "ácido masticadienónico", "masticadienoico" y "ácido masticadienónico" se pueden usar de manera intercambiable.

Como se usa en el presente documento, los términos "ácido isomasticadienoico", "ácido isomasticadienónico", "isomasticadienoico" e "isomasticadienónico" se pueden usarse de manera intercambiable.

- 15 Como se usa en el presente documento, "sustancialmente desprovisto" significa que una preparación o composición farmacéutica de acuerdo con la invención que, en general, contiene menos de aproximadamente un 5 % de la sustancia declarada. Por ejemplo, menos de aproximadamente un 3 %, menos de un 1 %, menos de un 0,5 %, menos de un 0,1 %.

Como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a esa cantidad de un ingrediente farmacéutico que induce, promueve o produce sustancialmente un efecto terapéutico deseado.

- 20 Como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente o vehículo que se usa para potenciar la administración y/o las propiedades farmacocinéticas de un ingrediente farmacéutico con el que está formulado, pero que no tiene un efecto terapéutico por sí solo, ni induce o causa ningún efecto indeseable o adverso o reacción adversa en el sujeto.

Como se usa en el presente documento, "vehículo hidrófobo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente o vehículo no polar hidrófobo en el que se disuelve o suspende una fracción de mástique.

- 25 Como se usa en el presente documento, "diferenciación celular" se refiere al proceso en el cual una célula menos especializada se convierte en una célula más especializada. La diferenciación celular se puede establecer sobre la base de los cambios en cualquiera de una serie de características celulares, incluyendo, pero sin limitarse a, el tamaño, la conformación, el aspecto de los orgánulos, el potencial de membrana, la actividad metabólica y la capacidad de respuesta a las señales. Se puede dar un "grado" particular a un tipo de célula para describir el alcance de la diferenciación.
- 30

Como se usa en el presente documento, "deterioro de la función neurológica" se refiere a un descenso o disminución en al menos una de función sensitiva, cognitiva o motora, en comparación con un nivel previo de función o actividad, y/o en comparación con individuos sin deterioro emparejados de acuerdo con criterios aceptados.

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" en referencia a un valor numérico establecido en el presente documento se debe entender como el valor establecido +/- un 10 %.

Ácidos triterpenoicos y fracciones ácidas aisladas que comprenden ácidos terpenoicos

- 40 En el presente documento se divulgan composiciones que comprenden combinaciones específicas de ácidos terpenoicos, tales como las que se encuentran en fracciones ácidas aisladas de almáciga. Se muestra que dichas composiciones que consisten en compuestos de ácidos triterpenoicos específicos tienen un efecto sinérgico inesperado en comparación con los mismos compuestos de ácidos triterpenoicos individuales en el tratamiento de la apoplejía. Los compuestos de ácido triterpenoico pueden ser de una fuente vegetal, en particular almáciga, o pueden ser productos de reacciones de síntesis química. En algunos casos, las composiciones pueden corresponder a combinaciones de compuestos, en los que algunos se sintetizan químicamente y otros se derivan de fuentes vegetales.
- 45

Las especies vegetales útiles para obtener las composiciones de la invención son las del género *Pistacia*.

Las especies útiles de *Pistacia* incluyen, sin limitación, *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *P. palestina*, *P. saportae*, *P. terebinthus*, *P. vera* y *P. integerrima*.

- 50 Están disponibles preparaciones comerciales de mástique, por ejemplo, de la Asociación de productores de goma de lentisco de Quíos, o de G. Baldwin & Co., Reino Unido.

Los procedimientos analíticos para determinar la composición química precisa de la fracción ácida aislada obtenida de la almáciga incluyen la resonancia magnética nuclear (por ejemplo, ¹H-RMN y ¹³C-RMN), la viscometría, diversos procedimientos de espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF), HPLC,

procedimientos de combinación tales como cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), espectrometría UV-VIS, espectrometría IR y FT-IR, y otros procedimientos conocidos en la técnica.

El procedimiento usado para obtener fracciones ácidas aisladas de la almáciga se puede describir a continuación. A modo de descripción general, se combina el material vegetal recogido, por ejemplo, almáciga, en un recipiente adecuado con un disolvente adecuado, normalmente un disolvente polar. Los disolventes polares adecuados incluyen, por ejemplo, alcoholes, éteres, ésteres, amidas, aldehídos, cetonas, nitrilos y combinaciones de los mismos.

Ejemplos particulares de disolventes orgánicos polares son metanol, etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, *sec*-butanol, *t*-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, neopentanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2-metil-2-butanol, etilenglicol, éter monometílico de etilenglicol, éter dietílico, éter metiletilico, éter etilpropílico, éter metilpropílico, 1,2-dimetoxietano, tetrahidrofurano, dihidrofurano, furano, pirano, dihidropirano, tetrahidropirano, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetaldehído, formiato de metilo, formiato de etilo, propionato de etilo, propionato de metilo, diclorometano, cloroformo, dimetilformamida, acetamida, dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidona, acetona, etil metil cetona, dietilcetona, acetonitrilo, propionitrilo y combinaciones de los mismos.

La almáciga y el disolvente se combinan preferentemente de modo que el disolvente esté en gran exceso, por ejemplo 10:1 o 20:1. La mezcla se puede agitar de forma periódica o continua durante un período que va desde unos pocos minutos hasta varias horas. El disolvente se puede decantar sin ningún tratamiento, u opcionalmente, la mezcla se puede someter en primer lugar a centrifugación a baja velocidad, por ejemplo a 100 a 2000 rpm, como es conocido en la técnica. El material insoluble se recupera del extracto y se añade una nueva parte de disolvente al material insoluble, de modo que el procedimiento de extracción y disolución se repite durante varios ciclos, para obtener la mayor cantidad posible de los compuestos solubles en disolventes polares. Después de la etapa de disolución final, se combinan los extractos que contienen material soluble en disolvente polar y se evapora el disolvente polar (por ejemplo, usando una evaporación rotatoria como es conocida en la técnica), para producir material soluble en disolvente polar, que se puede denominar extracto crudo, o "de primera etapa".

El material del extracto de primera etapa se combina con un disolvente orgánico no polar y se extrae por agitación durante un período de 1 a 2 horas. Los disolventes no polares adecuados incluyen hidrocarburos alifáticos acíclicos o cíclicos, saturados o insaturados, e hidrocarburos aromáticos insaturados, por ejemplo, alcanos C5-C10, cicloalcanos C5-C10, hidrocarburos aromáticos C6-C14, y combinaciones de los mismos. Cada uno de los anteriores puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, por ejemplo, perfluoroalcanos C7-C14. Los ejemplos particulares de disolventes orgánicos no polares son pentanos, hexanos, heptanos, octanos, nonanos, decanos, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, benceno, tolueno, xileno e isómeros y mezclas de los mismos. El material que permanece insoluble o que precipita en presencia del disolvente no polar se retira y se desecha. La fracción soluble en disolvente no polar se obtiene a continuación evaporando el disolvente no polar (por ejemplo, por evaporación rotatoria). Esta fracción se puede denominar extracto purificado o "de dos etapas", que corresponde a una fracción aislada de almáciga que se caracteriza por el hecho de que es soluble tanto en un disolvente polar como en un disolvente no polar, mientras que los materiales que son solubles en el disolvente polar pero insolubles en el disolvente no polar se han retirado.

El material del extracto de segunda etapa se disuelve posteriormente en un disolvente orgánico y esta solución se extrae repetidamente (por ejemplo, cuatro veces) con una solución acuosa básica. Se puede realizar una segunda extracción con una solución acuosa básica diferente. La fracción básica así obtenida se acidifica con una solución ácida acuosa diluida a pH ácido. La solución acuosa acidificada se extrae varias veces con un disolvente orgánico. Los extractos de disolventes orgánicos combinados así obtenidos (también denominados "extracto de tres etapas") se tratan con un agente de secado. Esta fracción ácida aislada de la almáciga se obtiene a continuación evaporando el disolvente orgánico (por ejemplo, por evaporación rotatoria). Esta fracción se denomina fracción ácida aislada de la almáciga. Se pueden llevar a cabo etapas intermedias adicionales de secado y/o retirada de disolvente entre otras etapas, como es conocido en la técnica. De forma alterativa, el material del extracto de segunda etapa se puede combinar con una resina de intercambio iónico básica, por ejemplo, Amberlyst® A26. La resina de intercambio iónico aislada se trata con una solución ácida no acuosa para liberar la fracción ácida de la resina. La fracción ácida aislada se obtiene a continuación evaporando el disolvente no acuoso y cualquier exceso de ácido.

El rasgo característico que distingue las fracciones ácidas aisladas descritas en el presente documento de los extractos de almáciga de la técnica anterior es que se han retirado determinados compuestos ácidos en las dos primeras etapas del procedimiento que de otro modo terminarían en la fracción ácida final. De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, los compuestos ácidos retirados durante las dos primeras etapas del procedimiento de aislamiento tienen un efecto perjudicial sobre las actividades biológicas beneficiosas de las fracciones ácidas aisladas divulgadas en el presente documento.

El extracto de tres etapas se puede secar más, por ejemplo, mediante tratamiento de alto vacío (por ejemplo, <0,01 mbar durante hasta varios días) para retirar el disolvente residual y otro material volátil, pesar y combinar con un disolvente orgánico no polar u otro vehículo para efectuar su disolución.

La fracción aislada se puede obtener mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- 5 (a) tratar la almáciga con un disolvente orgánico polar;
- (b) aislar una fracción soluble en dicho disolvente orgánico polar;
- (c) opcionalmente retirar dicho disolvente orgánico polar;
- (d) tratar la fracción soluble obtenida en la etapa (b) o (c) con un disolvente orgánico no polar,
- (e) aislar una fracción soluble en dicho disolvente orgánico no polar;
- 10 (f) opcionalmente, retirar dicho disolvente orgánico no polar;
- (g) disolver la fracción obtenida en la etapa (f) en un disolvente orgánico;
- (h) tratar la solución obtenida en la etapa (g) con una solución básica para obtener una fracción básica; y
- (i) acidificar la fracción básica obtenida en la etapa (h) con una solución ácida;
- (j) extraer la fracción acidificada obtenida en la etapa (i) con un disolvente orgánico;
- 15 (k) opcionalmente, poner en contacto la fracción orgánica obtenida en la etapa (j) con un agente de secado para retirar el agua restante;
- (l) retirar el disolvente orgánico y/o el exceso de ácido de la fracción obtenida en cualquiera de las etapas (i), (j) o (k); y
- (m) disolver la fracción aislada obtenida en la etapa (1) en un vehículo.

- 20 El tratamiento con una solución básica (basificante) en la etapa (h) puede comprender extraer la solución obtenida en la etapa (g) con una o más soluciones acuosas básicas adecuadas; o poner en contacto la solución obtenida en la etapa (g) con una resina de intercambio iónico básica. En el caso de una resina de intercambio iónico básica, la resina se puede tratar posteriormente con una solución ácida para liberar la fracción ácida capturada. La fracción ácida aislada se obtiene a continuación por retirada de cualquier componente volátil usado, por ejemplo, aplicación de vacío.
- 25

La etapa (h) puede comprender poner en contacto la solución obtenida en la etapa (g) con una resina de intercambio iónico básica, y, después de esto, retirar la resina de intercambio iónico básica por filtración. La resina de intercambio iónico básica se puede tratar posteriormente con una solución ácida para liberar la fracción ácida capturada. La fracción ácida aislada se obtiene a continuación por retirada de cualquier componente volátil usado, por ejemplo, aplicación de vacío.

- 30
- El procedimiento puede comprender además retirar el disolvente después de cualquiera de las etapas (c), (f) o (1). La retirada del disolvente se puede llevar a cabo por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo evaporación rotatoria, aplicación de alto vacío y una combinación de los mismos. En algunos modos de realización, las etapas (a) a (c) se llevan a cabo antes de las etapas (d) a (f) o viceversa. En algunos modos de
- 35 realización, el disolvente orgánico polar comprende etanol, el disolvente orgánico no polar comprende hexano y el disolvente orgánico usado para la extracción ácido-base comprende éter dietílico. Como se entiende fácilmente por los expertos en la técnica, las etapas (a) a (c) y las etapas (d) a (f) se pueden llevar a cabo independientemente durante varios ciclos para optimizar el procedimiento de extracción y el grado de purificación del producto.

- 40 La etapa (h) puede comprender extraer la solución obtenida en la etapa (g) con una solución acuosa básica y recoger la fracción orgánica obtenida de la misma. El procedimiento puede comprender además combinar la fracción orgánica obtenida de la etapa (h) con una fracción obtenida en cualquiera de las etapas (i), (j) o (k).

La fracción orgánica obtenida en la etapa (h) se puede combinar con una fracción obtenida en cualquiera de las etapas (i), (j) o (k) en una cantidad en el intervalo de aproximadamente un 0,1 a un 50 % de la fracción orgánica obtenida de la etapa (h). La cantidad puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,5-50 %; o un 2 a un 25 %; o un 0,1 a un 10 %.

- 45
- La fracción ácida aislada puede comprender al menos un ácido terpenoico, tal como una combinación de diversas combinaciones de ácido triterpenoico. Los ácidos triterpenoicos incluyen, por ejemplo, ácido masticadienólico, ácido isomasticadienólico, ácido isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil masticadienólico, ácido 3-O-acetil epi-masticadienólico, ácido 3-O-acetil isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil epi-isomasticadienólico,
- 50

ácido oleanónico, ácido oleanólico; ácido ursónico, ácido ursólico, ácido morónico y ácido 3-oxo-lup-20(29)-en-28-oico.

5 La fracción ácida aislada puede comprender al menos dos compuestos de ácido terpenoico, seleccionados de, por ejemplo, ácido masticadienólico, ácido isomasticadienoico, ácido isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil masticadienólico, ácido 3-O-acetil epimasticadienólico, ácido 3-O-acetil isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil epi-isomasticadienólico, ácido oleanónico, ácido oleanólico; ácido ursónico, ácido ursólico, ácido morónico y ácido 3-oxo-lup-20(29)-en-28-oico.

10 La fracción ácida aislada puede comprender al menos tres compuestos de ácido terpenoico, seleccionados de ácido masticadienólico, ácido isomasticadienoico, ácido isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil masticadienólico, ácido 3-O-acetil epimasticadienólico, ácido 3-O-acetil isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil epi-isomasticadienólico, ácido oleanónico, ácido oleanólico; ácido ursónico, ácido ursólico, ácido morónico y ácido 3-oxo-lup-20(29)-en-28-oico.

La fracción ácida aislada puede comprender al menos dos compuestos de ácido terpenoico, seleccionados de ácido masticadienólico, ácido isomasticadienoico y ácido oleanónico.

15 La fracción ácida aislada puede estar sustancialmente desprovista de ácidos triterpenoicos particulares, tales como, por ejemplo, ácido masticadienoico o ácido morónico.

La fracción ácida aislada puede estar sustancialmente desprovista de aceites esenciales.

Además, el ácido terpenoico y/o los ácidos triterpenoicos en la fracción ácida aislada pueden estar en forma monomérica, o en una forma oligomérica, tal como un dímero, un trímero, o combinaciones de los mismos.

20 **Composiciones farmacéuticas**

La composición para su uso en la invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una fracción ácida aislada de almáciga descrita en el presente documento, y un vehículo hidrófobo farmacéuticamente aceptable.

25 Por tanto, la invención también proporciona una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1. El ácido triterpenoico se puede aislar de un producto vegetal, tal como la almáciga, como se describe anteriormente en el presente documento, o puede ser el producto de una síntesis química. Además, la composición puede comprender una combinación de ácidos triterpenoicos, algunos de los cuales se sintetizan químicamente, y algunos de los cuales se aíslan de uno o más productos vegetales. La composición puede consistir en al menos dos compuestos de ácidos triterpenoicos como ingredientes farmacéuticamente activos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la composición puede comprender formas diméricas, triméricas y oligoméricas superiores de ácidos triterpenoicos; los oligómeros se pueden formar a partir de ácidos triterpenoicos monoméricos tanto idénticos como diferentes. La composición puede consistir en al menos tres compuestos de ácidos triterpenoicos como ingredientes farmacéuticamente activos y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Para la preparación de una composición para uso terapéutico, se pueden usar vehículos adecuados, tales como vehículos hidrófobos, incluyendo aceites farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en combinación con ceras, como se describe en el presente documento.

Un vehículo hidrófobo comprende al menos un aceite, tal como, por ejemplo, un aceite mineral, un aceite vegetal o combinaciones de los mismos.

40 El término "aceite mineral" se refiere a un líquido transparente, incoloro, casi inodoro e insípido, obtenido de la destilación del petróleo. También se puede denominar aceite blanco, aceite mineral blanco, aceite de vaselina, vaselina líquida o aceite de parafina blanca. El aceite mineral puede ser un aceite mineral ligero, un producto disponible comercialmente que se puede obtener como producto de grado NF (Formulario Nacional) o como producto de grado USP (Farmacopea de EE. UU.). Para uso en la invención, el aceite mineral está preferentemente libre de compuestos aromáticos y compuestos insaturados.

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

50 El vehículo farmacéuticamente aceptable puede, de forma alternativa o además, comprender un sustituto del aceite. Los sustitutos del aceite incluyen alcanos que tienen al menos 10 carbonos (por ejemplo, isohexadecano), ésteres de benzoato, ésteres alifáticos, ésteres no comedógenos, compuestos de silicona volátiles (por ejemplo, ciclometicona) y sustitutos de silicona volátiles. Los ejemplos de ésteres de benzoato incluyen benzoato de alquilo C₁₂-C₁₅, benzoato de isoestearilo, benzoato de 2-etilhexilo, benzoato de dipropilenglicol, benzoato de

octildodecilo, benzoato de estearilo y benzoato de behenilo. Los ejemplos de ésteres alifáticos incluyen octanoato de alquilo C₁₂-C₁₅ y maleato de dioctilo. Los ejemplos de ésteres no comedógenos incluyen isononanoato de isononilo, isononanoato de isodecilo, dilinoleato dimérico de diisoestearilo, propionato de araquidilo e isononanoato de isotridecilo. Los ejemplos de sustitutos de silicona volátiles incluyen decanoato de isohexilo, isononanoato de octilo, octanoato de isononilo y dioctanoato de dietilenglicol.

La ciclometicona es una silicona de evaporación que se puede incluir en el vehículo para ayudar a hacer que la composición sea susceptible de expulsión desde un dispensador de pulverización. Además, debido a su propiedad de evaporación, la ciclometicona puede ayudar a retener y fijar la formulación en la superficie sobre la que se pulveriza, por ejemplo, un sitio de herida.

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

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

Para preparar la composición farmacéutica, la fracción ácida aislada de la almáciga se puede formular de forma adecuada como complejos de inclusión, nanoemulsiones, microemulsiones, polvos y liposomas. Un complejo de inclusión puede comprender al menos una ciclodextrina. Las ciclodextrinas pueden comprender hidroxipropil-β-ciclodextrina. Las nanoemulsiones pueden comprender gotículas que tienen un tamaño de partícula promedio de menos de 800 nm. Las gotículas pueden tener un tamaño de partícula promedio de menos de 500 nm o menos de 200 nm. Los polvos pueden ser polvos secados por pulverización. Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares. Una microemulsión puede comprender un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos incluyen, sin limitación, aceites de ricino polietoxilado, éster de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno (polisorbato), un poloxámero, un derivado de la vitamina E, éteres alquílicos de polioxietileno, estereatos de polioxietileno, gliceridos poliglicolizados saturados o combinaciones de los mismos.

En el presente documento se divulgan diversas formulaciones de la fracción ácida aislada de la almáciga y la preparación de las mismas en los ejemplos 7-11. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquier medio que logre su propósito previsto. Por ejemplo, la administración puede ser, por ejemplo, por ruta oral, parenteral, tópica, transdérmica, tal como, por ejemplo, rutas de administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, intrauterina, intrauretral, intracardíaca, intracerebral, intracerebroventricular, intrarrenal, intrarrenal, intrahepática, intratendinosa, intraósea, intratecal, dérmica, vaginal, rectal, inhalatoria, intranasal, ocular, auricular y bucal.

Además, la administración puede comprender una técnica o medio tal como electroporación o sonicación para ayudar en su administración, por ejemplo, por vía transdérmica. Otras técnicas que se pueden emplear incluyen, por ejemplo, la aplicación de radiofrecuencia o pulverización presurizada.

La dosis administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del sujeto, el uso de tratamiento simultáneo, si corresponde, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. La cantidad de la fracción ácida aislada de la almáciga en cualquier forma de dosificación unitaria comprende una cantidad terapéuticamente eficaz que puede variar dependiendo del sujeto receptor, la ruta y la frecuencia de administración.

En general, la cantidad de la fracción ácida aislada de la almáciga presente en la composición farmacéutica puede estar convenientemente en el intervalo de aproximadamente un 0,01 % hasta aproximadamente un 50 %, tal como de un 0,01 % hasta aproximadamente un 25 %, tal como un 0,01 % hasta aproximadamente un 12 % en peso por peso, basado en el peso total de la composición. Para su uso tópico, el porcentaje de la fracción ácida aislada de la almáciga en la composición puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,05 % hasta aproximadamente un 2,5 %. Para la administración por inyección, el porcentaje de la fracción ácida aislada de la almáciga en la composición puede estar convenientemente en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % hasta aproximadamente un 7 %. Para la administración oral, el porcentaje de la fracción ácida aislada de la almáciga en la composición puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 7 %.

En algunos ejemplos, las cantidades de ácido masticadienoico y ácido isomasticadienoico en las composiciones que consisten en estos dos compuestos como ingredientes activos pueden estar en el intervalo de aproximadamente un 0,05 % hasta aproximadamente un 20 % para cada compuesto. Para la administración por inyección, la cantidad para cada uno puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % hasta aproximadamente un 10 %. Para la administración tópica, la cantidad para cada uno puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,5 % hasta aproximadamente un 12 %. Para la administración oral, la cantidad para cada uno puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,5 % hasta aproximadamente un 15 %.

En algunos ejemplos, la cantidad de ácido oleanónico, ácido masticadienoico y ácido isomasticadienoico en las composiciones que consisten en estos tres compuestos como ingredientes activos puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,05 % hasta aproximadamente un 15 % para cada compuesto. Para la administración por inyección, la cantidad para cada uno puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % hasta

5 aproximadamente un 10 %. Para la administración tópica, la cantidad para cada uno puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,5 % hasta aproximadamente un 12 %. Para la administración oral, la cantidad para cada uno puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,5 % hasta aproximadamente un 15 %.

Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar de una manera que es conocida por los expertos en la técnica, por ejemplo, por medio de procedimientos convencionales de mezcla, granulación, fabricación de grageas, encapsulación en gelatina blanda, disolución, extracción o liofilización. Se pueden obtener

10 composiciones farmacéuticas para su uso oral combinando los compuestos activos con excipientes sólidos y semisólidos y conservantes adecuados, y/o antioxidantes. Opcionalmente, la mezcla resultante se puede moler y procesarse. La mezcla resultante de gránulos se puede usar, después de añadir auxiliares adecuados, si es necesario, para obtener comprimidos, cápsulas de gelatina blanda, cápsulas o núcleos de grageas.

Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como sacáridos, por ejemplo, lactosa o sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa y/o fosfatos de calcio, por ejemplo, fosfato tricálcico o hidrogenofosfato de calcio; así como aglutinantes, tales como pasta de almidón, que usan, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona. Si se desea, se pueden añadir

20 agentes disgregantes tales como los almidones mencionados anteriormente y también carboximetil-almidón, polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Los auxiliares son agentes reguladores de flujo y lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico o sales del mismo, como estearato de magnesio o estearato de calcio, y/o polietilenglicol. Los núcleos de grageas están provistos de recubrimientos adecuados que, si se desea, son resistentes a los jugos gástricos. Para este propósito, se pueden

25 usar soluciones concentradas de sacáridos, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Para producir recubrimientos resistentes a los jugos gástricos, se usan soluciones de preparaciones de celulosa adecuadas, tales como ftalato de acetilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa. Se pueden añadir tintes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas, por ejemplo, para

30 identificación o para caracterizar combinaciones de dosis del compuesto activo.

Otras composiciones farmacéuticas para su uso oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas y selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los compuestos activos en forma de gránulos, que se pueden

35 mezclar con cargas, tales como lactosa; aglutinantes, tales como almidones; y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos se disuelven o suspenden preferentemente en líquidos adecuados, tales como aceites grasos o vaselina líquida. Además, se pueden añadir estabilizantes.

Otras composiciones farmacéuticas para su uso oral incluyen una película diseñada para adherirse a la mucosa oral, como se divulga, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 4.713.243, 5.948.430, 6.177.096, 6.284.264,

40 6.592.887 y 6.709.671.

Las composiciones farmacéuticas en forma de supositorios consisten en una combinación del compuesto o los compuestos activos con una base de supositorio. Las bases de supositorio adecuadas incluyen, por ejemplo, triglicéridos naturales o sintéticos, polietilenglicoles o hidrocarburos parafínicos.

Las formulaciones para administración parenteral incluyen suspensiones y dispersiones de micropartículas de los compuestos activos según sea apropiado. Se pueden administrar suspensiones oleosas para inyección. Los

45 disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo, triglicéridos, polietilenglicol 400, cremofor o ciclodextrinas. Las suspensiones para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede

50 contener estabilizantes.

También se pueden preparar composiciones farmacéuticas usando liposomas que comprenden el ingrediente activo. Como es conocido en la técnica, los liposomas se derivan, en general, de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable que

55 pueda formar liposomas. En general, los lípidos preferentes son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Son conocidos en la técnica procedimientos para formar liposomas, como se divulga, por ejemplo, en Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976) y en la patente de EE. UU. n.º 7.048.943.

Las formulaciones para administración tópica incluyen pomadas. Los vehículos adecuados incluyen aceites vegetales o minerales, vaselina filante, aceites o grasas de cadena ramificada, grasas animales y ceras. Los vehículos preferentes son aquellos en los que el ingrediente activo es soluble. También se pueden incluir estabilizantes, humectantes y antioxidantes, así como agentes que imparten color o fragancia, si se desea. Se pueden formular pomadas, por ejemplo, mezclando una solución del ingrediente activo en un aceite vegetal tal como aceite de almendra con parafina suave y tibia, y dejando que la mezcla se enfríe.

La composición farmacéutica puede comprender una emulsión o microemulsión de aceite en agua para facilitar su formulación para su uso oral, parenteral o tópico. Dichas emulsiones/microemulsiones incluyen, en general, lípidos, tensioactivos, opcionalmente humectantes y agua. Los lípidos adecuados incluyen aquellos conocidos, en general, como útiles para crear emulsiones/microemulsiones de aceite en agua, por ejemplo ésteres glicéricos de ácidos grasos. Los tensioactivos adecuados incluyen aquellos conocidos, en general, por ser útiles para crear emulsiones/microemulsiones de aceite en agua en las que se usan lípidos como el componente de aceite en la emulsión. Pueden ser preferentes tensioactivos no iónicos, tales como, por ejemplo, aceite de ricino etoxilado, fosfolípidos y copolímeros de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno. Los humectantes adecuados, si se usan, incluyen, por ejemplo, propilenglicol o polietilenglicol.

La composición farmacéutica se puede formular en forma de un gel, tal como un hidrogel formado a partir de un polímero formador de gel, tal como carragenina, goma xantana, goma karaya, goma arábica, goma de algarrobo, goma guar. Un hidrogel se puede combinar con una emulsión de aceite en agua que comprende el ingrediente activo.

La composición farmacéutica se puede formular en forma de un cemento tal como los que comprenden polimetilmetacrilato (PMMA) o fosfato de calcio, como se usan en cirugía ortopédica.

La composición farmacéutica se puede formular en forma de un polvo, en particular tal como los usados para aplicaciones transdérmicas que usan radiofrecuencia, como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 6.074.688 y 6.319.541, y el documento WO 2006/003659.

La composición farmacéutica se puede formular en forma de un pegamento, tal como los que comprenden octocianoacrilato usado para aplicaciones de cierre de heridas.

Usos terapéuticos

También se divulgan, pero no forman parte de la presente invención, usos terapéuticos y procedimientos para tratar el deterioro de la función neurológica, tratar trastornos de la piel y el cuero cabelludo, inducir la reparación de tejidos y heridas en un sujeto que lo necesite. Los procedimientos comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una fracción ácida aislada de almáciga, como se describe en el presente documento. El procedimiento puede comprender administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una combinación de al menos dos ácidos triterpenoicos seleccionados de: ácido masticadienólico, ácido isomasticadienoico, ácido isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil masticadienólico, ácido 3-O-acetil epimasticadienólico, ácido 3-O-acetil isomasticadienólico, ácido 3-O-acetil epi-isomasticadienólico y ácido oleanónico. El procedimiento puede comprender administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una combinación de al menos dos ácidos triterpenoicos seleccionados de ácido masticadienólico; ácido isomasticadienoico y ácido oleanónico.

El procedimiento puede comprender administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende ácidos triterpenoicos que consisten en ácido masticadienoico y ácido isomasticadienoico. El procedimiento puede comprender administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende ácidos triterpenoicos que consisten en ácido oleanónico, ácido masticadienoico y ácido isomasticadienoico.

La etapa de administrar las composiciones puede comprender cualquier ruta aceptable incluyendo oral, tópica, parenteral y transdérmica, tal como, por ejemplo, la administración parenteral incluye rutas de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, intrauterina, intrauretral, intracardiaca, intracerebral, intracerebroventricular, intrarrenal, intrahepática, intratendinosa, intraósea, intratecal, dérmica, vaginal, rectal, inhalatoria, intranasal, ocular, auricular y bucal.

La etapa de administración puede comprender poner en contacto células de un tipo particular, de un linaje particular o en una fase particular de diferenciación, con la composición. Las células pueden ser cualquiera de una amplia variedad de tipos de células, incluyendo, en particular, neuronas, células neuronales, células endoteliales, células epiteliales y células madre de dichos linajes. Además, las células pueden ser de cualquier linaje, por ejemplo, linajes ectodérmicos, mesodérmicos, entodérmicos y células madre de dichos linajes. La etapa de poner en contacto las células se puede llevar a cabo *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Las células que se van a poner en contacto pueden ser células madre y el contacto de las células se lleva a cabo *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*. Las células madre se pueden poner en contacto *in vivo* o *ex vivo*. Las células madre también se pueden poner en contacto *in vitro*.

El procedimiento divulgado en el presente documento para tratar el deterioro de la función neurológica es en particular ventajoso para los sujetos afectados por afecciones y enfermedades neurodegenerativas, incluyendo, en particular, traumatismos, apoplejía, demencia vascular, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM) y enfermedad de Parkinson.

- 5 En otros casos, el procedimiento se puede aplicar en sujetos que sufren un deterioro de la función neurológica debido a una infección (por ejemplo, vírica, bacteriana, fúngica, parasitaria).

El procedimiento se puede aplicar en sujetos que sufren un deterioro de la función neurológica alterada debido a un trastorno inmunitario.

El deterioro de la función neurológica se puede deber a la exposición a un fármaco, tal como un anestésico.

- 10 El deterioro de la función neurológica también puede estar asociado con una afección seleccionada del grupo que consiste en esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, obesidad, anorexia y caquexia.

- Los trastornos de la piel y el cuero cabelludo pueden incluir todos los trastornos de la piel, cuero cabelludo y anejos pilosos, incluyendo, por ejemplo, las uñas y los folículos pilosos. Las afecciones particulares que se pueden beneficiar de la invención incluyen alopecia, eccema, psoriasis, queratosis seborreica, seborrea y heridas en la piel. Las heridas en la piel incluyen úlceras venosas en las piernas, úlceras por presión, úlceras de pie diabético, quemaduras, heridas por amputación, úlceras de decúbito (escaras de decúbito), injertos donantes de piel de espesor parcial, sitios donantes de injerto de piel, sitios de implantación de dispositivo médico, heridas por mordedura, heridas por congelación, heridas por punción, heridas de metralla, dermoabrasiones, contusiones, heridas de una infección y heridas quirúrgicas. Las heridas pueden ser el resultado de una infección; exposición a radiaciones ionizantes; exposición a láser, o exposición a un agente químico.
- 15
- 20

- También se divulga, pero no forma parte de la invención, la capacidad de ser eficaz y económico para el tratamiento de heridas tórpidas crónicas. Como es conocido por un experto en la técnica, la eficacia de un tratamiento particular para promover la cicatrización se puede evaluar mediante diversos criterios, incluyendo la velocidad de cierre medida por la longitud, anchura y profundidad de la herida a lo largo del tiempo, la tasa de epitelización, la formación de tejido de granulación y la resistencia a la tracción del tejido.
- 25

También se divulga, pero no forma parte de la invención, la capacidad de la composición para inducir y promover la prolongación de la vida en humanos, mamíferos no humanos, aves y peces.

- Los procedimientos divulgados en el presente documento para inducir o promover la regeneración tisular son en particular ventajosos para sujetos que tienen daño tisular que, por ejemplo, puede estar asociado con, o ser el resultado de, una lesión o traumatismo. Los procedimientos para inducir o promover la regeneración tisular se pueden usar en sujetos que han sufrido una lesión o traumatismo seleccionado del grupo que consiste en un infarto de miocardio, una embolia pulmonar, un infarto cerebral, una enfermedad oclusiva de una arteria periférica, una hernia, un infarto esplénico, una úlcera venosa, una axotomía, un desprendimiento de retina, una herida (por ejemplo, una quemadura, una herida por mordedura, una herida por congelación, una herida por punción, una herida de metralla, una contusión, una herida por infección o una herida quirúrgica), una infección y un procedimiento quirúrgico. La invención puede ser eficaz para la reparación de heridas sin cicatrices.
- 30
- 35

- El procedimiento se puede llevar a cabo antes o después de la implantación de un dispositivo médico en el sujeto. Los dispositivos médicos incluyen, pero no se limitan a, una prótesis, un órgano artificial o un componente del mismo, una válvula, un catéter, un tubo, una endoprótesis vascular, una membrana artificial, un marcapasos, un sensor, un endoscopio, un dispositivo de formación de imágenes, una bomba, un alambre y un implante. Los implantes incluyen, pero no se limitan a, un implante cardíaco, un implante coclear, un implante corneal, un implante craneal, un implante dental, un implante maxilofacial, un implante de órgano, un implante ortopédico, un implante vascular, un implante intraarticular y un implante mamario.
- 40

- El dispositivo médico puede ser un implante de órgano, que en determinados casos puede comprender células autólogas del sujeto.
- 45

La etapa de poner en contacto puede comprender un medio seleccionado del grupo que consiste en electroporación, sonicación, radiofrecuencia, pulverización presurizada y combinaciones de los mismos.

- La etapa de poner en contacto puede comprender establecer contacto entre el líquido intersticial y la composición. Esto puede ser en particular ventajoso para heridas que están rodeadas por líquido intersticial. El contacto entre el líquido intersticial y la composición se puede lograr perforando y/o separando la dermis con una aguja, una microaguja o un aparato que comprende una pluralidad de agujas o microagujas. Dichas agujas o microagujas son preferentemente no huecas y pueden estar configuradas en una pluralidad, por ejemplo, en un aparato similar a un peine o cepillo.
- 50

- El procedimiento divulgado en el presente documento es adecuado para su aplicación en seres humanos, mamíferos no humanos, peces y aves.
- 55

Artículos de fabricación

El procedimiento divulgado en el presente documento puede englobar el uso de un artículo de fabricación que incorpora la composición que comprende la fracción ácida aislada de la almáciga descrita en el presente documento.

- 5 La composición farmacéutica puede estar en forma de un recubrimiento en el artículo de fabricación, o puede estar contenida dentro de un recipiente que es parte integral del artículo de fabricación. La composición farmacéutica está presente de forma ventajosa como un recubrimiento en dispositivos que se insertan en el cuerpo y están destinados a la integración en el mismo, por ejemplo, un implante. La composición farmacéutica puede promover, por tanto, el cierre del tejido sobre el implante debido a la actividad de la fracción ácida aislada de la almáciga para inducir la diferenciación celular.

La composición farmacéutica se puede incorporar de forma ventajosa sobre o en artículos usados en la cicatrización o la reparación de tejidos, por ejemplo, un apósito o vendaje. La composición farmacéutica puede promover, por tanto, la cicatrización debido a la actividad de la fracción ácida aislada de la almáciga para inducir la diferenciación celular.

- 15 En otros casos, la composición farmacéutica se puede incorporar a un dispositivo de administración tal como una aguja, un dispositivo de inyección o un dispensador de pulverización desde el cual la composición se administra a un sitio del cuerpo que requiere tratamiento, por ejemplo, un sitio de herida.

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

- 20 El artículo de fabricación puede comprender una pluralidad de microagujas. Los dispositivos médicos y los implantes son como se describen anteriormente en el presente documento.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar de manera más completa determinados modos de realización de la invención. Sin embargo, no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del amplio alcance de la invención.

EJEMPLOS**Ejemplo 1 Preparación de fracción ácida aislada de almáciga.**

- Se combinó resina de mástique (10 g) con etanol absoluto (200 ml) y se dejó reposar la mezcla durante la noche. Se agitó la mezcla a 150 rpm durante aproximadamente 15 minutos, dejando una goma insoluble en el fondo del matraz. Se dejó sedimentar cualquier partícula insoluble más grande durante 20 minutos y se transfirió el etanol a un nuevo matraz. Se agitó el resto con una parte nueva de etanol absoluto (150 ml) a 200 rpm durante 10 minutos. Se combinó esta fracción de etanol con la primera fracción. Se repitió el procedimiento con otra parte de 150 ml de etanol absoluto que se combinó con las dos primeras fracciones de etanol. Posteriormente, se retiró el etanol a vacío usando un evaporador rotatorio (temperatura del baño de agua 30 °C). Se le añadió hexano (300 ml) al residuo restante y se agitó la mezcla a 150 rpm durante dos horas. Después de dejar reposar toda la noche en el matraz cerrado para completar la disolución del material soluble y la precipitación de cualquier material insoluble, se transfirió la solución límpida de hexano a un matraz limpio previamente pesado y se retiró el hexano usando un evaporador rotatorio, proporcionando aprox. 6 gramos de material extraído. El material extraído obtenido se disolvió posteriormente en éter dietílico (300 ml) y se extrajo con una solución acuosa al 5 % de carbonato de sodio (4 x 100 ml), seguido de extracción con hidróxido de sodio acuoso 0,1 N (3 x 100 ml). Los dos extractos acuosos básicos se acidificaron por separado a pH 1-2 mediante la adición lenta de ácido clorhídrico acuoso al 10 % y luego se extrajeron con éter dietílico nuevo (3 x 100 ml). Las fracciones de éter así obtenidas se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. Después de filtrar el sulfato de sodio, se retiró el éter dietílico usando un evaporador rotatorio. Esto dio aprox. 3 gramos de fracción ácida aislada de almáciga como un sólido blanco.

- 45 Para comparación, la adición de hexano a la fracción ácida preparada de acuerdo con las enseñanzas del documento WO2003/092712 o Parachos *et al.*, (2007), Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51(2), 551, mostró que una cantidad sustancial de esa fracción ácida era insoluble en hexano. Cuando este material insoluble en hexano se sometió a prueba en el ensayo *in vitro* descrito en el ejemplo 4 como una solución etanólica al 1 % (se encontró que era en gran parte insoluble en aceite de semilla de algodón), se encontró que provocaba un estrés intenso a las células. Se usó etanol plano como control negativo y no provocó ningún estrés ni daño a las células en los volúmenes usados. Además, una solución etanólica al 1 % de la fracción ácida preparada de acuerdo con la presente invención indujo una diferenciación eficaz de las células en células neuronales. Este resultado indica claramente que la fracción ácida divulgada en el presente documento está libre del material perjudicial que está presente en las fracciones ácidas divulgadas en la técnica anterior.

- 55 **Ejemplo 2. Preparación de una composición al 5 % (p/p) de fracción ácida aislada de almáciga en aceite de semilla de algodón de grado USP/NF (RPh-Ac).**

A 1 gramo de la fracción ácida aislada obtenida del ejemplo 1 se le añadió 19 gramos de aceite de semilla de algodón (USP/NF) y se agitó la mezcla a 150 rpm hasta obtener una composición límpida y homogénea (aprox. 2 horas).

Ejemplo 3. Aislamiento y caracterización química de la fracción ácida aislada del mástique.

- 5 Se extrajo resina de mástique de *Pistacia lentiscus* L. de acuerdo con el ejemplo 1 para obtener la fracción que se analizó mediante HPLC en fase inversa (figura 1) para identificar los componentes principales. El análisis de HPLC es consecuente con la presencia de la fracción aislada de ácido morónico y ácido oleanónico en la fracción aislada, sobre la base de comparación con los patrones analíticos.

- 10 Las condiciones usadas para el procedimiento de HPLC en fase reversa de la fracción ácida aislada fueron: Caudal: 1 ml/min; longitud de onda de detección UV 220 nm; concentración de la muestra 1 mg/ml; volumen de inyección 20 µl; la aguja y la bomba se lavan a presión con acetonitrilo acuoso al 20 %; flujo de ELSD-nitrógeno 1 ml/min; temperatura de evaporación -80 °C; temperatura de nebulización 60 °C; gradiente de ácido acético al 0,8 %-ACN.

La proporción de gradiente para las muestras de sustancia ácida y formulación se muestra en la tabla 1:

15 **Tabla 1**

tiempo	A-ácido acético al 0,8 %	B-ACN
0	20	80
5	20	80
25	7,7	92,3
45	8	92
48	0	100
55	0	100
57	20	80
67	20	80

- 20 Los datos de los espectros de masas de la fracción ácida aislada (figuras 2A-D y figura 3A) muestran picos que indican la presencia de ácidos triterpénicos monoméricos tales como ácido morónico, ácidos oleanónicos y otros (MH^+ a 455 Da; M^+Na a 477 Da. También están presentes en los datos de los espectros de masas picos correspondientes a ácidos triterpenoicos diméricos (MH^+ a 910 Da; M^+Na a 932 Da), así como picos indicativos de las formas triméricas de ácidos triterpenoicos (MH^+ a 1364 Da; M^+Na a 1387).

Para aislar y determinar la estructura de otros constituyentes principales de la fracción ácida aislada, se desarrolló un procedimiento de HPLC preparativa. Usando este procedimiento, se aislaron posteriormente seis constituyentes principales de la fracción ácida aislada mediante HPLC preparativa.

- 25 Se desarrolló un procedimiento de HPLC preparativa en una columna preparativa de 30 × 250 mm (ACE-121-2530). Se inyectaron muestras de la fracción aislada (aprox. 75 mg por experimento) usando un bucle de 5 ml.

Detalles del procedimiento:

Longitud de onda de detección: 205 nm; Caudal: 15 ml/min

Eluyentes:

1. ácido acético al 0,8 %:acetonitrilo:THF = 25:72:3
- 30 2. ácido acético al 0,8 %:acetonitrilo:THF = 15:82:3
3. ácido acético al 0,8 %:acetonitrilo:THF = 10:87:3
4. ácido acético al 0,8 %:acetonitrilo:THF = 5:92:3

Pauta: Antes del acondicionamiento de la columna, se tiene que lavar con acetonitrilo de grado HPLC durante al menos 40 minutos. El tiempo total de desarrollo es de aprox.155 minutos.

- 35 Acondicionamiento: Eluyente de desarrollo 1 durante 30 min.

Carga: Inyectar 5 ml de solución de 75 mg de muestra en MeOH

Elución:

Eluyente 1: 0-10 minutos

Eluyente 2: hasta la elución del pico 2

Eluyente 3: hasta 10 minutos después de la elución del pico 4

5 Eluyente 4: hasta 10 minutos después de la elución del pico 6

El cromatograma del procedimiento de HPLC preparativa se muestra en la figura 4.

Los compuestos correspondientes a los seis picos indicados en la figura 4 se aislaron y caracterizaron por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

10 De hecho, se demostró que el pico 1 y el pico 2 son, respectivamente, ácido morónico y ácido oleanónico tras la comparación de los espectros de RMN con los datos de la literatura. Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de estos dos ácidos se muestran en las figuras 5A-B (Pico 1, ácido morónico) y 6A-B (Pico 2, ácido oleanónico), respectivamente. El ácido morónico también se identificó positivamente mediante comparación con una muestra comercial. El ácido oleanónico se comparó de forma adicional y se encontró que era idéntico a una muestra preparada por oxidación de ácido oleanólico de acuerdo con un procedimiento de la literatura (Helv. Chim. Acta 15 Vol.83, p.1766 (2000).

Se demostró que los picos 3-6 son ácido masticadienoico (pico 3), ácido isomasticadienoico (pico 4), ácido 3-O-acetil masticadienólico (pico 5) y ácido 3-O-acetil-isomasticadienólico (pico 6), respectivamente. Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de estos se muestran en las Figs. 7A-B, figuras 8A-B, figuras 9A-B y figuras 10A-B, respectivamente. (Para referencia - Parachos *et al.*, (2007), Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51(2), 551 20 y referencias en el mismo).

Ejemplo 4. Estudios biológicos de RPh-Ac en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE)

Estudios que pretendían evaluar los efectos de RPh-Ac en diversas líneas celulares de origen humano dieron lugar al uso de células ARPE-19, una línea celular humana no cancerosa del epitelio pigmentario de la retina.

25 El epitelio pigmentario de la retina (RPE) es una capa única de células epiteliales pigmentadas hexagonales de origen neuronal, que forman la capa de células más externa de la retina del ojo y están unidas a la coroides subyacente. Las funciones del RPE incluyen el apoyo, la nutrición y la protección de los fotorreceptores subyacentes de la neurorretina.

Las células ARPE-19 están implicadas en la fagocitosis del segmento externo de las células fotorreceptoras, en el ciclo de la vitamina A, donde isomerizan el *todo-trans*-retinol a 11-*cis*-retinal y suministran a los fotorreceptores 30 D-glucosa, aminoácidos y ácido ascórbico.

Aunque *in vivo* el RPE es pigmentado, las células ARPE-19 no forman melanina y no son pigmentadas. En cultivo, las células crecen con una conformación fusiforme y como células poligonales.

Procedimientos

35 Se colocaron células ARPE-19 (obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC)) en microplacas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano (Costar) a una concentración de 2.5×10^3 células por pocillo ($1-2.5 \times 10^4$ células/ml) en un medio de crecimiento que consistía en DMEM:Ham F-12, 1:1, complementado con suero fetal bovino al 10 %, glutamina 200 mM, penicilina 100 unidades/ml y estreptomycin 100 µg/ml. Se dejó que las células se adhiriesen a las superficies de la placa durante la noche antes del tratamiento con RPh-Ac.

40 Se preparó RPh-Ac esencialmente como se describe en el ejemplo 2, para proporcionar una solución al 2,5 % en un vehículo compuesto de aceite de semilla de algodón. Se añadieron las preparaciones a los pocillos en volúmenes de 0,5 µl, 1 µl, 1,5 µl, 2 µl. Estos volúmenes, introducidos en un volumen de medio de muestra global de 200 µl, corresponden a concentraciones finales de RPh-Ac de un 0,0125 %, un 0,025 %, un 0,0375 % y un 0,05 %, respectivamente. El vehículo de aceite sirvió como vehículo de control y se aplicó a cultivos de control en los mismos volúmenes.

45 Se incubaron los cultivos en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 48 horas. A continuación se extrajo el medio, se lavaron los cultivos dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijaron con metanol absoluto durante 10 min y se tiñeron con reactivos Hemacolor® (Boehringer Mannheim), que tiñen células de una manera similar a Giemsa, y se pueden usar en un ensayo de viabilidad celular cuantitativo (Keisari, Y. A colorimetric microtiter assay for the quantitation of cytokine activity on adherent cells in tissue 50 culture. J. Immunol. Methods 146, 155-161, 1992).

Para determinar la expresión de las proteínas marcadoras, sinaptofisina, Akt fosforilada (pAkt^{Ser473}) y GSK3-beta^{Ser9} fosforilada) en respuesta al tratamiento de las células con RPh-Ac, se colocaron las células en cubreobjetos de vidrio estériles sumergidos en microplacas de 24 pocillos a una concentración de 5,10⁴ células/pocillo en un medio que consistía en una mezcla 1:1 de medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) y medio Ham F12, complementado con suero fetal bovino 10 y penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y glutamina (2 mM).

Se dejó que las células se adhiriesen durante la noche a los cubreobjetos y se le añadió RPh-Ac al 2,5 % en aceite de semilla de algodón al cultivo en un volumen de 20 µl/ml de medio y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂, durante 48 h. El vehículo de aceite sirvió como vehículo de control y se aplicó a cultivos de control en el mismo volumen.

A continuación se lavaron las células 2X con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Para determinar la expresión de proteínas de sinaptofisina, pAkt^{Ser473} y phosph-GSK3-beta^{Ser9} en las células, se tiñeron los cubreobjetos de vidrio con anticuerpos monoclonales de ratón/conejo (Ab) dirigidos contra la sinaptofisina humana, pAkt^{Ser473} y pGSK3-beta^{Ser9}, seguido de un anticuerpo contra IgG de ratón/conejo marcado con FITC. Los núcleos de las células se contratiñeron con DAPI. A continuación se evaluaron la preparación problema y de control en un microscopio de fluorescencia. Los resultados se presentan en las figuras 13A-C, a continuación en el presente documento.

Resultados

Se encontró inesperadamente que el tratamiento de las células RPE ARPE-19 con RPh-Ac induce cambios morfológicos espectaculares que son inequívocamente característicos de neurodiferenciación. Los cambios morfológicos no se produjeron en los cultivos de control tratados con el vehículo de aceite solo, y se observaron resultados similares entre los cultivos problema tratados con RPh-Ac, independientemente del aceite usado como vehículo del compuesto activo. Los cambios morfológicos también se asociaron con el cese de la proliferación celular, lo que respalda aún más la conclusión de que RPh-Ac induce la neurodiferenciación.

Los cultivos de control tratados con aceite mostraron el patrón típico de crecimiento fusiforme y poligonal característico de las células RPE ARPE-19 (figura 11A). Después de 48 horas de incubación en cultivo, las células tratadas con RPh-Ac (0,01 %; 0,2 mg/ml) tenían una modificación de su conformación y desarrollaron protuberancias únicas, muy largas, gruesas y con tinción densa, que recordaban a axones de células neuronales. Después de 48 horas de incubación, las células tratadas con RPh-Ac (0,025 %; 0,25 mg/ml) mostraron un número mayor de protuberancias largas más delgadas que recordaban a las dendritas; y después de 48 horas de incubación con RPh-Ac, las protuberancias largas y delgadas formaron uniones con protuberancias similares en células contiguas, creando una red de células interconectadas, que potencialmente podían comunicar información entre sí (figura 11B). Redes similares se producen normalmente entre las neuronas en el sistema nervioso central y permiten la transmisión y el procesamiento de la información.

Mientras que las células de control proliferaron durante el período de incubación de 48 horas (figura 11C), las células tratadas con RPh-Ac dejaron de proliferar rápidamente y las células permanecieron en una densidad dispersa, lo que respalda aún más la noción de diferenciación celular.

Un sistema de puntuación de la potencia en la inducción de la diferenciación celular

En base a los resultados anteriores, se desarrolló un sistema de puntuación para evaluar la potencia de las fracciones para inducir la diferenciación en cultivo celular, con células colocadas en placas a una concentración de 2 × 10³ por pocillo. Los grados y sus respectivas descripciones se exponen en la tabla 2.

Tabla 2

Efecto	Grado
Tasa de proliferación	Alta = 0 Media = 1 Baja = 2
Las células están formando protuberancias alargadas	No = 0 protuberancias = 1 similar a neuronas = 2
<u>Neuritas</u> proporción (alargamientos de tipo neuronal)/soma	≤2 = 0 >2 ≤3 = 1

Efecto	Grado
	>3 = 4
Porcentaje de células diferenciadas	$\leq 10\% = 0$ $>10\% \leq 30\% = 1$ $>30\% \leq 70\% = 2$ $\geq 70\% = 3$
Uniones claramente visibles entre neuritas y/o somas	$\leq 30\%, = 0$ $>30\% < 70\%, = 1$ $\geq 70\% = 2$
Botones sinápticos visibles y claros a lo largo de las neuritas y en los extremos de las neuritas	$< 30\% = 0$ $>30\% < 50\% = 1$ $\geq 70\% = 2$

Se realizaron los mismos ensayos usando los siguientes tratamientos:

- Vehículo de aceite de semilla de algodón (control negativo) (los resultados se muestran en la figura 11C)
- Fracción ácida de acuerdo con el documento WO2003/097212 y material insoluble en hexano aislado de la fracción ácida de acuerdo con las enseñanzas del documento WO 2003/097212, 1 % en etanol (los resultados se muestran en la figura 12A)
- RPh-Ac, 1 % en etanol (los resultados se muestran en la figura 12B)
- Vehículo de etanol (control negativo) (los resultados se muestran en la figura 12C).

Los resultados de acuerdo con la tabla de puntuación anterior para evaluar la diferenciación observada en las figuras 11 y 12, en respuesta a los diversos tratamientos, se representan en las tablas 3 y tabla 4, a continuación.

Tabla 3

Nombre de las fracciones	Ácida documento WO 2003/092712				RPh-Ac				Vehículo (aceite de semilla de algodón)			
Volumen (ul)	3,5	5	7	10	2	3,5	5	7	2	3,5	5	7
Grado de diferenciación	1	2	2	4**	4	3	10	-*	0	0	0	0
Puntuación de diferenciación	1	2	2	3**	3	3	4	-*	0	0	0	0
* En estas cantidades, las células habían alcanzado una diferenciación completa y, posteriormente, murieron de forma natural antes del final de las 48 horas de incubación.												
** Las células estaba claramente estresadas y mostraron, en el mejor de los casos, solo indicios de diferenciación.												

Tabla 4

Nombre de las fracciones	Ácida insoluble en hexano documento WO2003/092712 (1 % p/p en) etanol				RPh-Ac (1 % p/p en etanol)				Vehículo (Etanol)			
Volumen (ul)	3,5	5	7	10	2	3,5	5	7	2	3,5	5	7
Grado de diferenciación	1	1**	2**	2**	4	3	15	-*	0	0	0	0
Puntuación de diferenciación	1	1**	2**	2**	3	3	5	-*	0	0	0	0
* En estas cantidades, las células habían alcanzado una diferenciación completa y, posteriormente, murieron de forma natural antes del final de las 48 horas de incubación.												
** Las células estaba claramente estresadas y mostraron solo indicios tempranos de diferenciación.												

A continuación se lavaron las células 2X con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Para determinar la expresión de proteínas de sinaptofisina, pAkt^{Ser473} y phosph-GSK3-beta^{Ser9} en las células, se tiñeron los cubreobjetos de vidrio con anticuerpos monoclonales de ratón/conejo dirigidos contra la sinaptofisina humana,

pAkt^{Ser473} y phosphor-GSK3-beta^{Ser9}, seguido de un anticuerpo contra IgG de ratón/conejo marcado con FITC. Los núcleos de las células se contratiñeron con DAPI. A continuación se evaluaron la preparación problema y de control en un microscopio de fluorescencia. Los resultados se presentan en las figuras 13A-C, a continuación en el presente documento.

Los resultados mostrados en las figuras 13A, demuestran que, en las células tratadas con la composición RPh-Ac, los altos niveles de grupos de sinaptofisina fueron evidentes en los procesos celulares (panel superior), en comparación con las células de control (panel inferior) donde la sinaptofisina no se expresa en absoluto. La sinaptofisina es una vesícula sináptica abundante en el cerebro y regula la formación de sinapsis dependiente de la actividad en las neuronas. La sinaptofisina se ha usado ampliamente para identificar la formación de sinapsis en células neuronales en diferenciación.

Las actividades de GSK-3 están reguladas negativamente por la fosforilación de serina. La inactivación de GSK-3beta es una diana reguladora principal de la vía de supervivencia de fosfatidil-inositol 3-cinasa/Akt y ejerce algunos de sus efectos neuroprotectores. La inactivación de GSK-3 se ha propuesto como un mecanismo para promover las funciones de supervivencia neuronal, incluyendo la regulación de la formación de neuritas y la modulación de la neurotransmisión glutamatérgica. La inhibición de GSK-3 beta también se ha relacionado con la morfología axonal y el agrupamiento de proteínas sinápticas en neuronas en desarrollo. La regulación incorrecta de las vías de señalización y fosforilación de sustrato mediadas por GSK-3 se ha relacionado con las condiciones fisiopatológicas de una variedad de enfermedades, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la diabetes de tipo 2 y el cáncer, la esquizofrenia y los trastornos del estado de ánimo.

Los resultados mostrados en la figura 13B, demuestran que las células tratadas con la composición RPh-Ac presentan niveles altos de pAkt^{Ser473} (panel superior), en comparación con las células tratadas con vehículo (panel inferior). Los resultados mostrados en la figura 13C demuestran que las células tratadas con la composición RPh-Ac presentan niveles altos de pGSK-beta^{Ser9}, así como cambios en su localización, en comparación con las células tratadas con vehículo (panel inferior). Estos resultados sugieren que la composición RPh-Ac inactiva GSK3 beta mediante su fosforilación en Ser9 a través de la activación de Akt (fosforilación de Ser 473).

Ejemplo 5. Efecto sinérgico de combinaciones de compuestos específicos de triterpenoides de la fracción ácida aislada en el modelo de MCAO de rata.

La apoplejía es una causa importante de discapacidad grave a largo plazo y la tercera causa de muerte en los Estados Unidos. Las apoplejías isquémicas comprenden más de un 88 % de todas las apoplejías, lo que las convierte en el tipo más común de lesión cerebrovascular. Las afecciones isquémicas en el cerebro provocan la muerte neuronal, lo que da lugar a deficiencias sensitivomotoras y cognitivas permanentes. El modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) es un modelo fiable para apoplejía en ratas e imita la afección en humanos. La oclusión de la MCA da lugar a una lesión de la corteza sensitivomotora debido a pérdida neuronal. El nivel de esta lesión se puede valorar mediante evaluación histológica del tamaño del infarto y diversas pruebas de comportamiento. La mejora del comportamiento después de la inducción de la apoplejía y los volúmenes bajos de infarto indican un mejor estado patológico y probablemente sean el resultado de neuroprotección o neurogénesis. Por lo tanto, el modelo de MCAO puede servir como un sistema de prueba fiable para evaluar la eficacia de fármacos como agentes terapéuticos contra afecciones de deterioro neurológico, tales como, por ejemplo, enfermedades/afecciones cerebrales y neurodegenerativas.

Para los experimentos descritos en el presente documento, se anestesia a los animales usando una solución de ketamina/xilazina. A continuación, se rasura el cuello del animal y se realiza una incisión en la línea media en la piel del cuello, y el tejido que se encuentra debajo se disecciona por disección roma. La arteria carótida primitiva (CCA) derecha y su unión con la arteria carótida externa (ECA) y la arteria carótida interna (ICA) quedan expuestas por disección roma. A continuación, la CCA se cierra de forma transitoria colocando alrededor de ella un material de sutura de seda 3-0. La ECA se ocluye permanentemente con el mismo tipo de material de sutura. También se realiza un tercer cierre, transitorio, en la ICA con material de sutura de seda 3-0.

Se corta un pequeño orificio en la ECA y se inserta el hilo de nailon en la ICA, evitando la entrada en la arteria pterigopalatina. El hilo se inserta 21-25 mm hasta sentir una ligera resistencia. A continuación, se asegura el hilo con un nudo de sutura de seda 3-0.

Después de la cirugía, se devuelven las ratas a sus jaulas y permanecen debajo de una lámpara de calefacción hasta que despiertan.

Se monitorizan y registran dos parámetros durante el procedimiento de cirugía isquémica: temperatura central del animal y glucemia (BGL).

La temperatura central se monitoriza usando una sonda rectal (YSI USA modelo 400) conectada a una unidad de medición (Cole Parmer modelo 8402-00) durante todo el período de la cirugía. La lesión isquémica se inicia cuando la temperatura rectal es de 37 °C-38 °C.

En vista del efecto beneficioso de la composición de la fracción RPh-Ac en las células (como se ejemplifica anteriormente en el presente documento), se sometieron a prueba diversos compuestos comprendidos dentro de la fracción RPh-Ac para determinar sus efectos *in vivo*.

Abreviaturas usadas para los compuestos y combinaciones sometidos a prueba:

5 OA: Ácido oleanónico

MDA: Ácido masticadienoico

IMDA: Ácido isomasticadienoico

10 A las ratas de los diferentes grupos se les inyectó dos veces por semana por vía subcutánea 25 microlitros del producto experimental designado. La primera inyección se administró tres horas después de la inducción de la apoplejía.

Se usaron las siguientes formulaciones como productos experimentales para inyección:

- Vehículo: aceite de semilla de algodón
- IMDA: 0,65 % (p/p) en aceite de semilla de algodón
- MDA: 0,65 % (p/p) en aceite de semilla de algodón
- 15 - IMDA y MDA: cada uno 0,65 % (p/p) en aceite de semilla de algodón
- IMDA, MDA y OA: cada uno 0,65 % (p/p) en aceite de semilla de algodón

20 Se sometieron a prueba MDA solo, IMDA solo, una combinación de MDA+IMDA y una combinación de OA+MDA+IMDA, usando un modelo de MCAO de rata, por su capacidad terapéutica. Se trató a las ratas con apoplejía inducida con cada uno de los compuestos sometidos a prueba y la mejora de sus capacidades sensitivomotoras se sometido a prueba mediante la prueba de retirada de adhesivo. En esta prueba, una pequeña cinta adhesiva se adhiere a las patas delanteras de las ratas y sirve como estímulo táctil. Se registra el tiempo hasta que se retira la cinta. La cinta de retirada de adhesivo se realizó antes de la inducción de la apoplejía para evaluar el tiempo de referencia de cada grupo y 27 días después de la lesión, después de dos inyecciones a la semana de los productos experimentales.

25 **Resultados:**

Como se muestra en los gráficos de la figura 14A, que muestran el tiempo (en segundos) que tardaron las ratas en retirar la cinta adhesiva de la pata contralateral, solo el IMDA pudo mejorar la puntuación de las ratas tratadas en la prueba de retirada de adhesivo, en comparación con las ratas tratadas con vehículo. El MDA solo fue ligeramente mejor que el vehículo de control. Sin embargo, la combinación de IMDA+MDA u OA+MDA+IMDA (línea diagonal gruesa derecha) mejoró claramente la eficacia del tratamiento y los animales regresaron a su rendimiento de referencia (día 0, D0) el día 27 (D27).

30 Como el IMDA por sí solo casi restableció la puntuación de referencia de las ratas, se analizó la proporción de los productos experimentales beneficiosos con respecto al valor de referencia. Como se muestra en la figura 14B, el IMDA, que mejoró significativamente la afección sensitivomotora de la rata, fue todavía 10 veces peor que la puntuación de referencia. Esto sugiere que el IMDA por sí solo está limitado en su efecto y no puede restablecer completamente la función sensitivomotora de referencia. Sin embargo, sorprendentemente, las combinaciones de IMDA y MDA o la combinación de IMDA, MDA y OA aumentaron aún más la eficacia, dando como resultado una mejora espectacular de la capacidad sensitivomotora a un nivel incluso más bajo que el valor de referencia registrado. Estos resultados demuestran claramente el fuerte efecto sinérgico de las combinaciones de IMDA, MDA y OA.

40 Los resultados presentados en el presente documento respaldan firmemente el potencial terapéutico de la combinación de ácido isomasticadienoico y ácido masticadienoico o la combinación de ácido isomasticadienoico, ácido masticadienoico y ácido oleanónico, e indican un fuerte efecto sinérgico de estos compuestos entre sí con respecto al tratamiento del deterioro de la función neurológica y la regeneración del tejido neuronal.

45 **Ejemplo 6. Cicatrización en ratas**

Para las ratas usadas en el modelo de MCAo del ejemplo 5, se usó la cicatrización de las heridas quirúrgicas como un indicador del potencial de cicatrización de las formulaciones sometidas a prueba usadas en el ejemplo 5.

50 Los pictogramas mostrados en la figura 15 se tomaron de heridas durante el día 7 del modelo de MCAO, para ratas tratadas con vehículo (aceite de semilla de algodón simple, panel izquierdo), RPh-Ac (panel central) y la

mezcla de ácido oleanónico, ácido masticadienoico y ácido isomasticadienoico (derecha). Las fotografías indican claramente que las heridas de los animales tratados con RPh-Ac (panel central) o con la mezcla de ácido oleanónico, ácido masticadienoico y ácido isomasticadienoico (panel derecho) se encuentran en una fase más avanzada de cicatrización en comparación con la herida del animal tratado con vehículo.

5 **Ejemplo 7. Preparación de complejos de ciclodextrina**

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

La complejación de las fracciones ácidas aisladas descritas en el presente documento con β -HPCD se realizará de la siguiente manera:

- 15 a. Disolución de la fracción de goma de lentisco pesada previamente en una cantidad mínima de disolvente no polar tal como hexano, heptano o similares.
- b. Adición gota a gota del disolvente no polar al polvo de β -HPCD.
- c. Secado a 50 °C-80 °C hasta que el disolvente no polar se evapore.
- d. Mezcla con la cantidad necesaria de agua.
- 20 e. Disolución con sonicación y calentamiento.
- f. Filtración a través de un filtro de 0,2-0,45 μ m.

Ejemplo 8. Preparación de nanoemulsiones de fracción ácida aislada de almáciga.

Se deben preparar formulaciones líquidas de nanoemulsión de aceite en agua mediante técnicas de emulsificación a alta presión de todos los ingredientes lipídicos y el componente activo disuelto en la fase oleosa lipídica y emulsionado con una fase acuosa, proyectada para dar como resultado la formación de nanogotículas lipídicas que contienen el fármaco, estables, esféricas y dispersas uniformemente. La reducción del tamaño de gotícula en la emulsión es esencial para generar formulaciones de fármaco con alta estabilidad. Las gotículas de nanoemulsión preferentes tienen un tamaño medio de gotícula de menos de un micrómetro (en general, en el intervalo de 0,1 a 0,2 μ m) uniformemente dispersas en una fase acuosa. La singularidad del gran núcleo de aceite hidrófobo interno de las gotículas de nanoemulsión proporciona una alta capacidad de solubilización para los compuestos insolubles en agua.

1. Preparación de la fase oleosa

La fase oleosa está compuesta de un 13 % de lipóide E-75, un 0,026 % de α TP-succinato, propilparabeno como antioxidante y un 86,9 % de Miglyol® 810. Se disuelve en la fase oleosa fracción de goma de lentisco preparada como en el ejemplo 1. Se mezclan los componentes con calentamiento suave hasta que se obtiene una solución solubilizada completamente homogénea.

2. Preparación de la fase acuosa

La fase acuosa está compuesta de un 0,1 % de EDTA, a un 0,5 % Tween-80, un 2,3 % de glicerol, metilparabeno como conservante y un 97,1 % de agua. El pH se ajustó a 7,4 mediante NaOH IN.

3. Mezcla de las fases oleosa y acuosa

Se calienta la fase oleosa (3,7 g) y se añade a 70 ml de la fase acuosa (precalentada). Se agita suavemente la mezcla durante 10-15 min a temperatura ambiente.

4. Preparación de emulsión gruesa de aceite en agua

Se prepara una emulsión de aceite en agua usando un dispensador de tamaño medio y la unidad de homogeneización de alto cizallamiento Polytron®, a 20 000 rpm durante 5 min.

5. Dimensionamiento de la emulsión en el intervalo submicrométrico mediante homogeneizador de alta presión Gaulin®

El tamaño de gotícula de la emulsión obtenida después de la etapa 4 se reduce al intervalo submicrométrico (nanométrico) sometiendo la emulsión a una homogeneización de alto cizallamiento usando el homogeneizador

de alta presión Gaulin® Microlab 70 a una presión de 800 bar. Se deben realizar un total de 5-6 ciclos para obtener gotículas de nanoemulsión homogéneas con un tamaño de partícula promedio de menos de 200 nm. Se debe determinar el tamaño de partícula por espectroscopia de correlación de fotones (PCS) usando un analizador de tamaño de partícula N4MD (Coulter® Electronics, Reino Unido). Cuando la mayoría de las partículas (>90 %) son más pequeñas de 200 nm, se determina que el procedimiento de dimensionamiento está completo.

6. Filtración estéril

Filtración en condiciones asépticas de la nanoemulsión a viales estériles usando un filtro estéril PES de 0,2 µm y almacenamiento a 40 °C.

Ejemplo 9. Preparación de polvo secado por pulverización.

Un procedimiento conveniente para fabricar el producto de mezcla de fracción de goma de lentisco-lípido es mediante secado por pulverización de la formulación a partir de una mezcla de dispersión de disolvente no polar que contiene todos los ingredientes lipídicos y agua que contiene los componentes hidrófilos, teniendo en cuenta consideraciones de rentabilidad y aumento de escala. El procedimiento de secado por pulverización seleccionado se optimiza para obtener un polvo fino y fluido. La fracción de goma de lentisco se tiene que disolver en la fase lipídica que contiene los ingredientes lipídicos lecitina, tricaprina (triglicérido del ácido cáprico), succinato de tocoferol y se calienta (~40 °C) en un disolvente no polar hasta obtener una buena dispersión. Se preparará una dispersión de dióxido de silicio de combustión (Cab-O-Sil®) en agua (5 %) hinchando el polvo en agua purificada. La suspensión resultante (precalentada a 40 °C) se puede verter a continuación lentamente en la dispersión lipídica del disolvente no polar y se agita la mezcla a 40 °C durante aproximadamente 1 h hasta que se obtiene una dispersión homogénea. A continuación, se tiene que secar la mezcla por pulverización usando el secador por pulverización Yamato Pulvis® GA32. Las condiciones típicas de secado por pulverización son: caudal de 7 ml/min, temperatura de entrada 130 °C, temperatura de salida 70 °C y flujo de aire de secado 0,5 m³/min. Se espera obtener un polvo seco homogéneo que contenga la mezcla de fracción de goma de lentisco-lípido.

Se espera que la formulación de la mezcla de fracción de la goma de lentisco-lípido preparada por el procedimiento de secado por pulverización directa muestre una buena dispersabilidad en agua, siendo, por tanto, adecuada para la preparación de formas farmacéuticas sólidas, tales como cápsulas de gelatina dura o comprimidos, para una administración oral potenciada con una buena biodisponibilidad oral.

Ejemplo 10. Preparación de preparaciones liposomales.

Se tienen que disolver lípidos que contengan la fracción ácida aislada disuelta de almáciga en 100 ml de diclorometano en un matraz de fondo redondo y agitar durante 30 min a temperatura ambiente hasta que se obtenga una solución límpida transparente. Se evaporará el disolvente usando una unidad de evaporación rotatoria a 39 °C. Las condiciones típicas incluyen la rotación del matraz a 4,5 rpm, 5 min a presión atmosférica, seguido de 10-30 min (hasta la evaporación total del disolvente) a vacío débil, y finalmente 15 min a vacío completo. Al final del procedimiento de evaporación, se creará una película lipídica uniforme. La película lipídica se disolverá en 15 ml de tampón isotónico. Se preparan liposomas mediante agitación vigorosa durante 10-30 min con un agitador de vaivén basculante, hasta que se forma una dispersión uniforme y lechosa del vehículo multilamelar (MLV) y no queda ninguna película lipídica restante. Para obtener una preparación de liposomas equilibrada y homogénea, el matraz se puede agitar adicionalmente a 37 °C durante 30-90 min a 270 rpm.

Ejemplo 11. Preparación de microemulsiones que contienen fracción ácida aislada de almáciga

Se pueden utilizar varios tensioactivos comúnmente usados en fármacos parenterales para desarrollar microemulsiones de agua en aceite y aceite en agua, aceptables para su uso inyectable, oral y tópico. Los tensioactivos farmacéuticamente aceptables adecuados para la formación de formulaciones de microemulsión incluyen tensioactivos no iónicos, incluyendo aceite de ricino hidrogenado polietoxilado 40 (vendido con el nombre comercial Cremophor RH40®), aceite de ricino polietoxilado 35 (vendido con el nombre comercial Cremophor® EL), ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno (polisorbatos), poloxámeros (Pluronic®), vitamina E-TPGS 1000 (VE-TPGS 1000), éteres alquílicos de polioxietileno, Solutol® HS-15, Tagat® TO, 6-oleato de peglicol, estearatos de polioxietileno o glicéridos poliaglicolizados saturados, todos los cuales están disponibles comercialmente. Los tensioactivos preferentes incluyen aceite de ricino hidrogenado polietoxilado 40 (Cremophor® RH40®), aceite de ricino hidrogenado polietoxilado 35 (Cremophor® EL), ésteres de ácido grasos de sorbitán de polioxietileno (polisorbatos), poloxámeros (Pluronic®) y vitamina E-TPGS 1000. La cantidad total de tensioactivo presente en la composición será, en general, de aproximadamente 100 hasta aproximadamente 700 mg/g, y preferentemente de aproximadamente 300 hasta aproximadamente 500 mg/g.

Se puede realizar la preparación de microemulsiones que contienen la fracción ácida aislada disolviendo la fracción ácida aislada en una cantidad apropiada de aceite, tal como glicéridos de cadena media (Miglyol) en un vial adecuado. A continuación se tapa el vial. Se coloca el vial en un baño de agua de aproximadamente 50 °C-60 °C y se agita suavemente hasta que todo el material del fármaco se disuelva por

completo. Después de enfriar el vial a temperatura ambiente, se añade una cantidad apropiada de tensioactivo (tal como Cremophor® EL o VE-TPGS) y se sigue de la mezcla de mono y diglicéridos de ácidos grasos, si corresponde. A continuación se tapa el vial y se coloca en el baño de agua de unos 50 °C-60 °C. Se agita suavemente el vial para obtener una solución límpida y uniforme. Esta solución se puede llenar en cápsulas de HPMC y almacenar a temperatura ambiente antes de la administración oral. De forma alternativa, los polvos de polímero sustituidos (tal como HPMC) se pueden añadir a la solución con agitación adecuada (es decir, remover, revolver) para obtener una suspensión polimérica uniforme. La composición resultante se puede llenar a continuación en cápsulas de gelatina blanda o de gelatina dura y almacenar a temperatura ambiente antes de la dosificación oral. De forma alternativa, se puede usar la formulación de microemulsión por vía tópica o filtrada a través de membranas de 0,2 µm para administrar por vía parenteral.

Las microemulsiones tienen buenas propiedades de dispersabilidad en agua y emulsionan cuando se diluyen en medios acuosos para formar pequeñas micelas nanométricas que tienen una biodisponibilidad potenciada.

Se debe entender que la fraseología o terminología empleada en el presente documento es con el propósito de descripción y no de limitación.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 - una cantidad eficaz de una fracción ácida aislada de almáciga, y
 - un vehículo farmacéuticamente aceptable,
- 5 para su uso en el tratamiento de la apoplejía,
 - en la que la fracción ácida aislada se obtiene a partir de una fracción aislada de almáciga que es soluble en al menos un disolvente orgánico polar y al menos un disolvente orgánico no polar por una extracción ácido-base, separando de este modo la fracción ácida aislada de la fracción no ácida de la fracción aislada de almáciga que es soluble en al menos un disolvente orgánico polar y uno orgánico no polar,
- 10 en la que dicha fracción ácida aislada está sustancialmente desprovista de compuestos que son solubles en dicho disolvente orgánico polar pero insolubles en dicho disolvente orgánico no polar, y
 - en la que la almáciga se deriva de una planta del género *Pistacia*.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la fracción ácida aislada comprende ácido isomasticadienónico.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la fracción ácida aislada comprende ácido isomasticadienónico, ácido masticadienónico y ácido oleanónico.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el disolvente polar es un alcohol seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, sec-butanol, *t*-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, neopentanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2-metil-2-butanol, etilenglicol, éter monometílico de etilenglicol.
- 20 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el disolvente no polar se selecciona del grupo que consiste en alcanos C₅-C₁₀, cicloalcanos C₅-C₁₀.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración de la fracción ácida aislada varía desde un 0,01 % a un 12 % (p/p), basado en el peso total de la composición.
- 25 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el disolvente orgánico polar comprende etanol y el disolvente orgánico no polar comprende hexano.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, obtenible mediante un procedimiento que comprende las etapas de:
 - (a) tratar la almáciga con un disolvente orgánico polar;
 - 30 (b) aislar una fracción soluble en dicho disolvente orgánico polar;
 - (c) opcionalmente retirar dicho disolvente orgánico polar;
 - (d) tratar la fracción soluble obtenida en la etapa (b) o (c) con un disolvente orgánico no polar,
 - (e) aislar una fracción soluble en dicho disolvente orgánico no polar;
 - (f) opcionalmente, retirar dicho disolvente orgánico no polar;
 - 35 (g) disolver la fracción obtenida en la etapa (f) en un disolvente orgánico;
 - (h) tratar la solución obtenida en la etapa (g) con una solución acuosa básica para obtener una fracción acuosa básica;
 - (i) acidificar la fracción acuosa básica obtenida en la etapa (h) con una solución ácida, para obtener una solución acuosa acidificada;
 - 40 (j) extraer la solución acuosa acidificada obtenida en la etapa (i) con un disolvente orgánico;
 - (k) opcionalmente, poner en contacto la fracción orgánica obtenida en el etapa (j) con un agente de secado para retirar el agua restante;
 - (l) retirar el disolvente orgánico y/o el exceso de ácido de la fracción obtenida en cualquiera de las etapas (i), (j) o (k); y

(m) disolver la fracción aislada obtenida en la etapa (1) en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la solución acuosa básica en la etapa (h) se prepara a partir de una base inorgánica seleccionada del grupo que consiste en carbonato de sodio, hidróxido de sodio, carbonato de potasio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, bicarbonato de sodio, fosfato de sodio, hidróxido de litio, carbonato de litio y fosfato de potasio.
- 10 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8,
en la que las etapas (a) a (c) se llevan a cabo antes que las etapas (d) a (f); o
en la que las etapas (d) a (f) se llevan a cabo antes que las etapas (a) a (c); o
10 en la que (a) a (c) y/o las etapas (d) a (f) se repiten para una pluralidad de ciclos.
- 11 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el disolvente orgánico en la etapa (g) comprende éter dietílico; y en la que el disolvente orgánico polar comprende etanol, y en la que el disolvente no polar comprende hexano.
- 15 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el disolvente orgánico en la etapa (j) es un éter dialquílico.
- 13 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la almáciga se obtiene de una especie de *Pistacia* seleccionada del grupo que consiste en *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *P. palestina*, *P. saportae*, *P. terebinthus*, *P. vera* y *P. integerrima*.
- 20 14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es un vehículo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en al menos un aceite, al menos una cera y combinaciones de los mismos, preferentemente en la que al menos un aceite se selecciona del grupo que consiste en aceite de semilla de algodón, aceite de almendra, aceite de canola, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de uva, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de azafrán, aceite de sésamo, aceite de soja y combinaciones de los mismos.

25

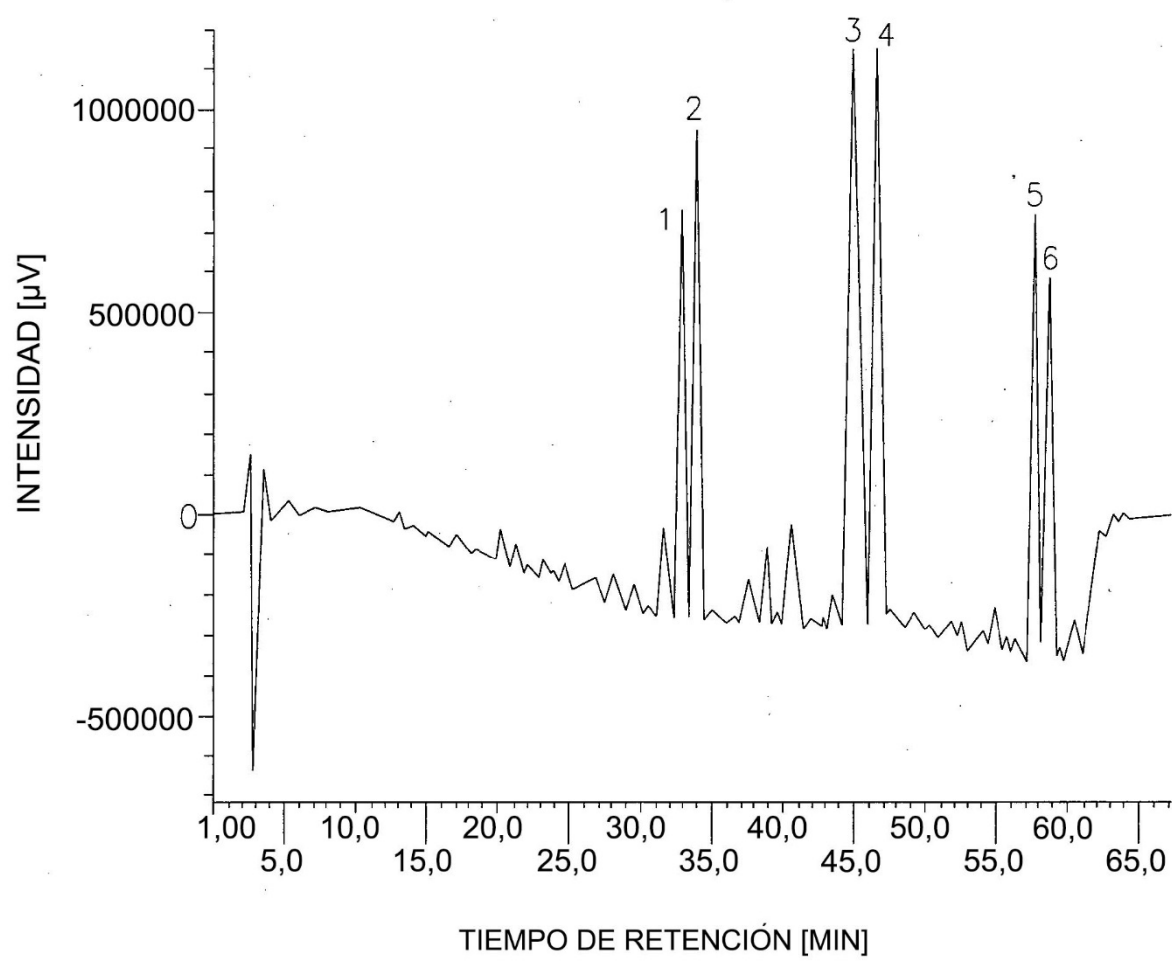


FIG.1

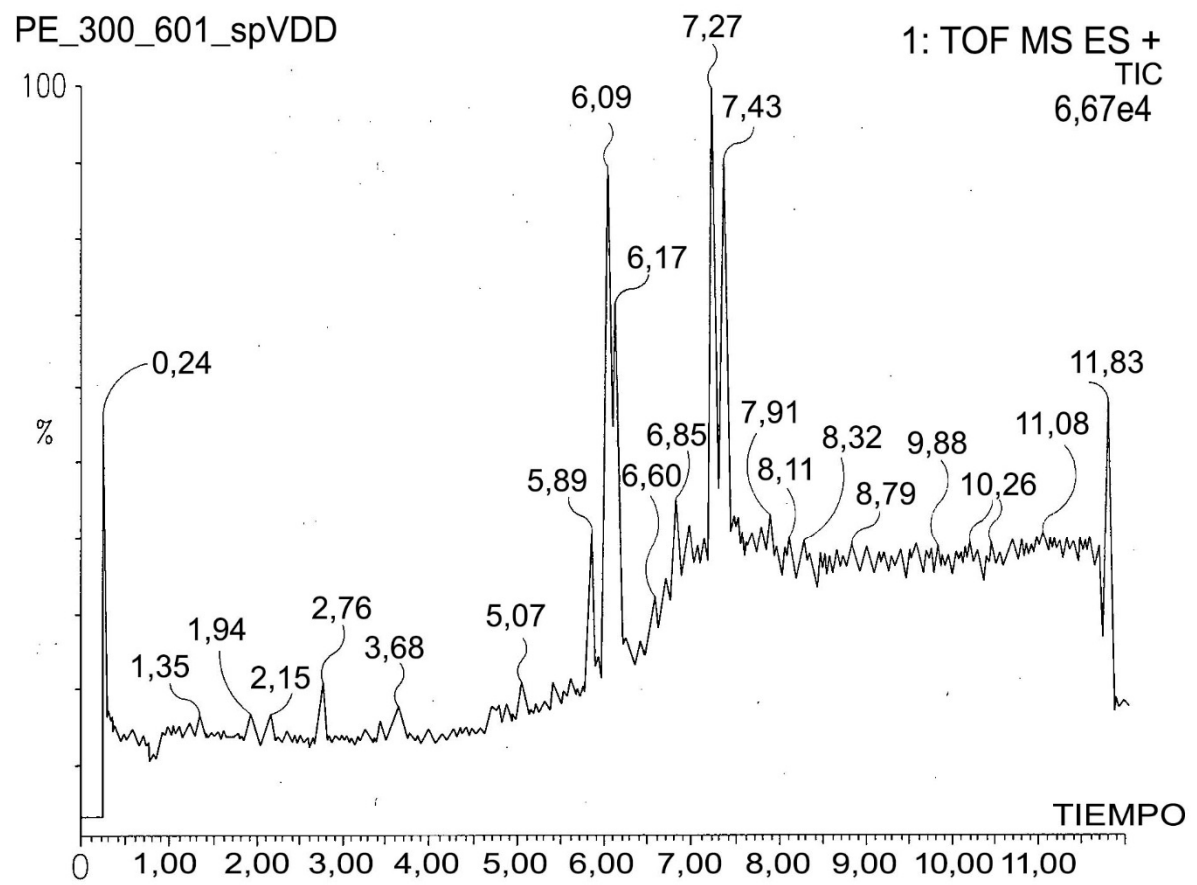


FIG.2A

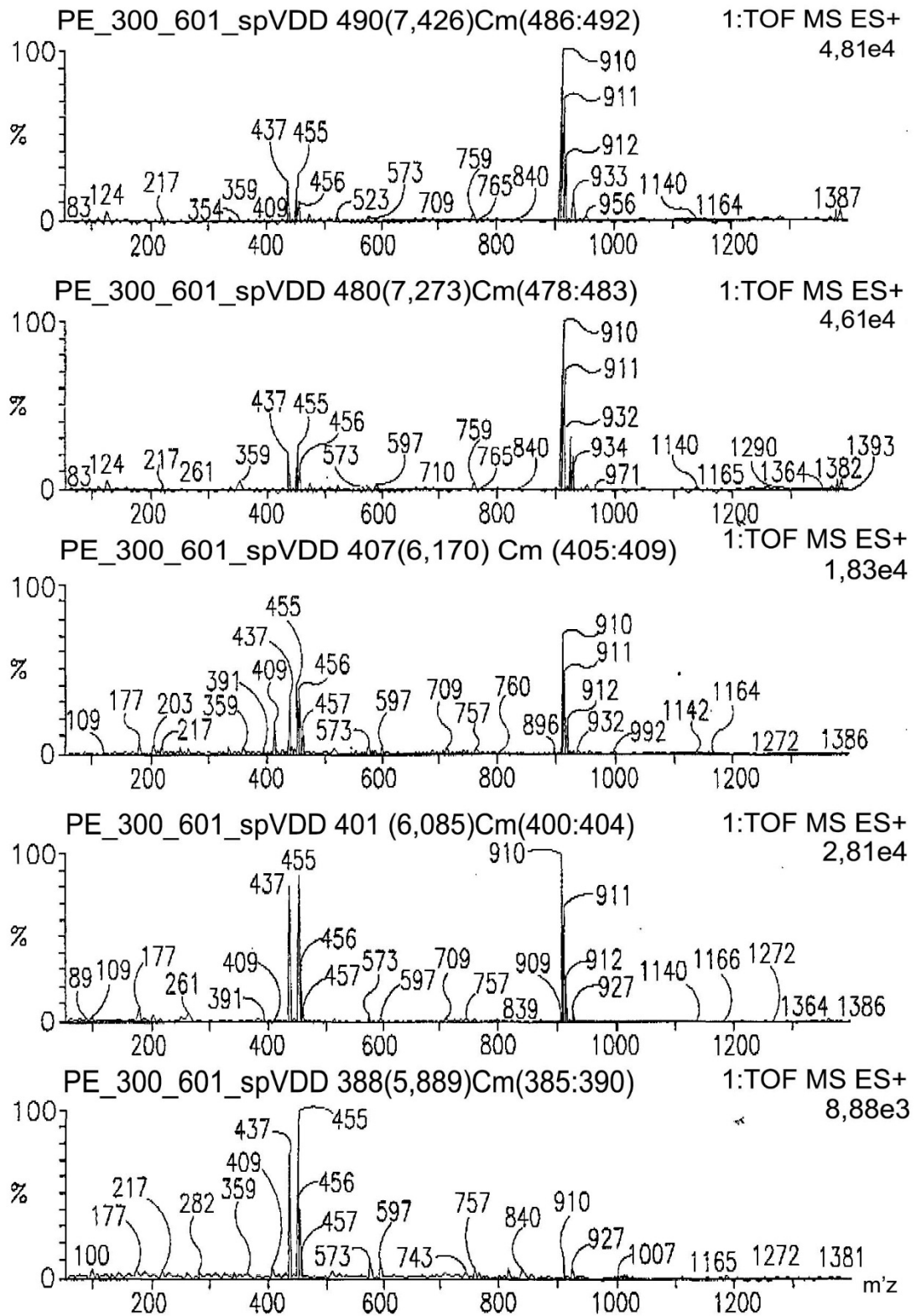


FIG.2B

PE_300_603_spVDD 402(6,099)Cm(399:406)

1:TOF MS ES+
8,86e4

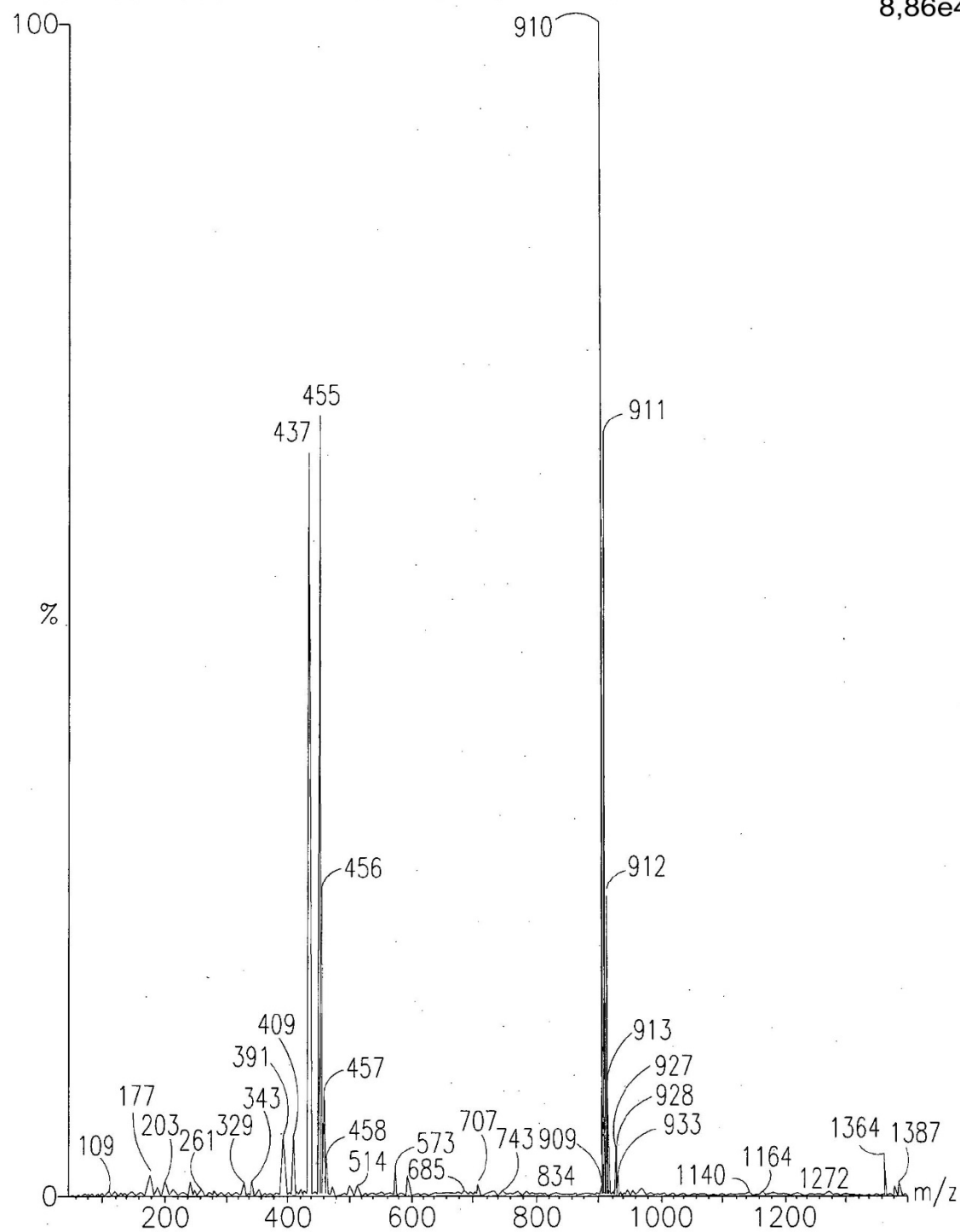


FIG.2C

PE_300_601_spVDD 407 (6,170)Cm(406:409)

1:TOF MS ES+
1,52e4

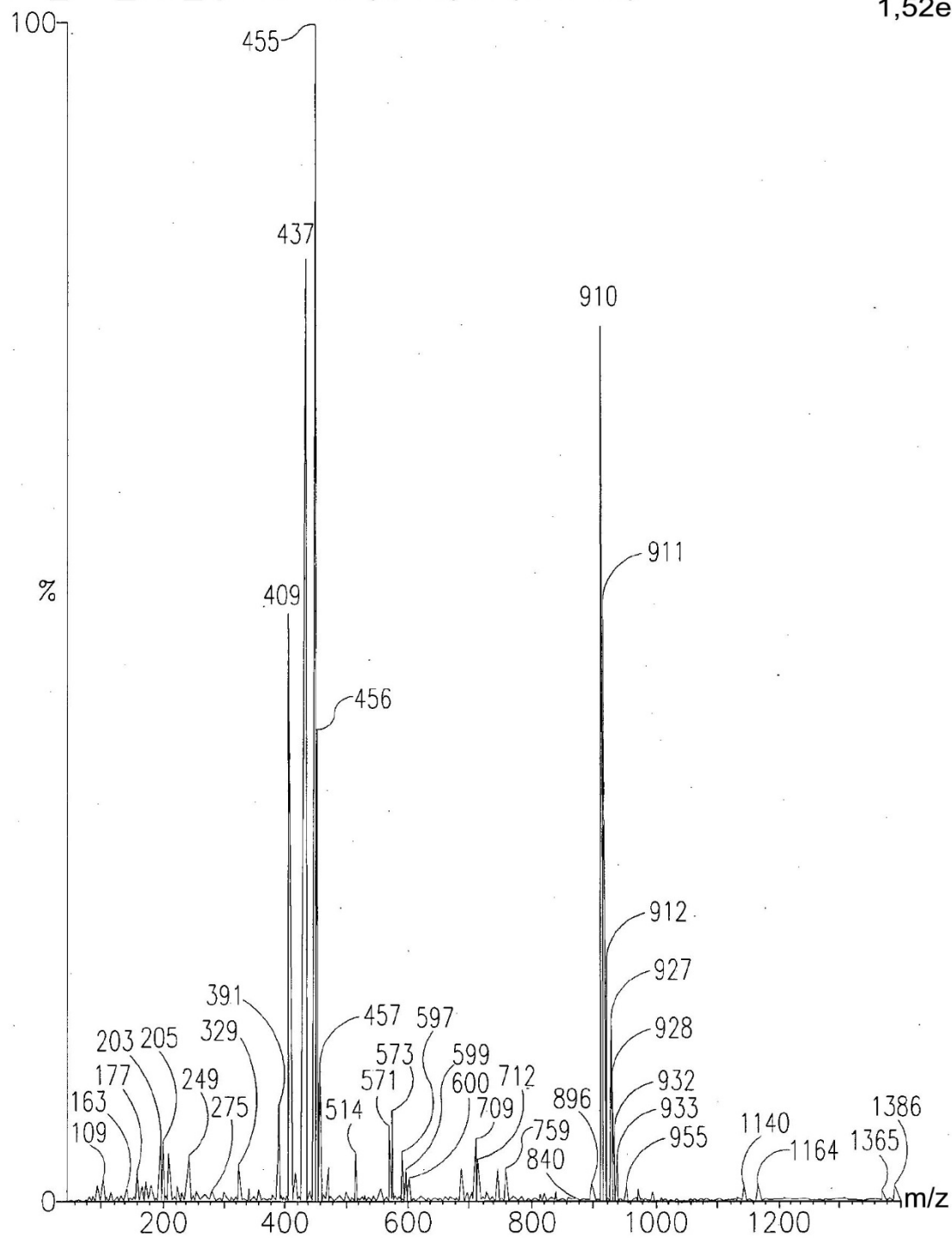


FIG.2D

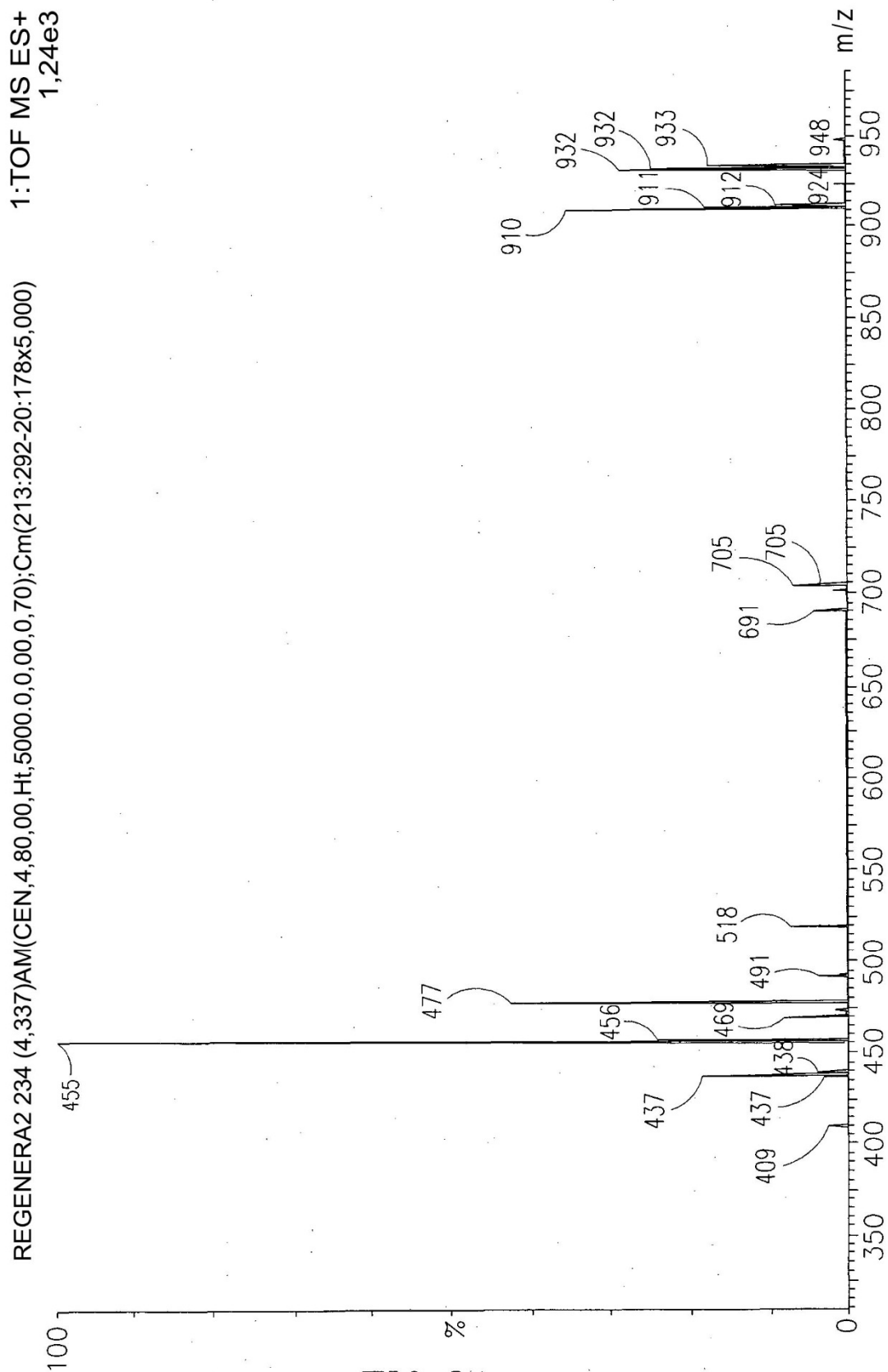


FIG.3A

03-JUN-2010

TOF MS

REGENERA2 234 (4,337)AM(CEN,4,80,00,Ht.5000,0,0,00,0,70);Cm(213:292-20:178x5,000)

	N.º: MASA: INTEN	%BPI	%TIC	N.º: MASA: INTEN	%BPI	%TIC
1:	409 3,01e1	2,42	0,58			
2:	437 3,40e1	2,74	0,65			
3:	437 2,33e2	18,73	4,46			
4:	438 5,26e1	4,24	1,01			
5:	439 4,89e1	3,94	0,94			
6:	455 3,50e1	2,82	0,67			
7:	455 1,24e3	100,00	23,83			
8:	456 7,40e1	5,95	1,42			
9:	456 3,00e2	24,12	5,75			
10:	469 1,02e2	8,22	1,96			
11:	471 4,10e1	3,30	0,79			
12:	474 2,20e1	1,77	0,42			
13:	477 5,01e2	42,75	10,19			
14:	491 4,24e1	3,41	0,81			
15:	493 1,24e1	1,00	0,24			
16:	518 9,26e1	7,45	1,78			
17:	691 4,67e1	3,76	0,90			
18:	691 5,40e1	4,34	1,04			
19:	691 4,00e0	0,82	0,08			
20:	702 2,00e1	1,61	0,38			
21:	705 4,68e1	3,77	0,90			
22:	705 8,56e1	6,88	1,64			
23:	705 4,15e1	3,34	0,80			
24:	705 3,93e1	3,17	0,75			
25:	910 4,37e2	35,12	8,37			
26:	910 1,73e2	13,92	3,32			
27:	910 4,50e1	3,62	0,86			
28:	911 2,20e2	17,73	4,23			
29:	911 4,20e1	3,38	0,61			
30:	912 700e0	0,56	0,13			
31:	912 1,08e2	8,68	2,07			
32:	913 1,37e1	1,10	0,26			
33:	924 1,49e1	1,20	0,29			
34:	932 3,55e2	28,59	6,81			
35:	932 3,02e2	24,30	5,79			
36:	932 3,42e1	2,75	0,68			
37:	933 2,18e2	17,52	4,18			
38:	948 1,35e1	1,09	0,26			

FIG.3B

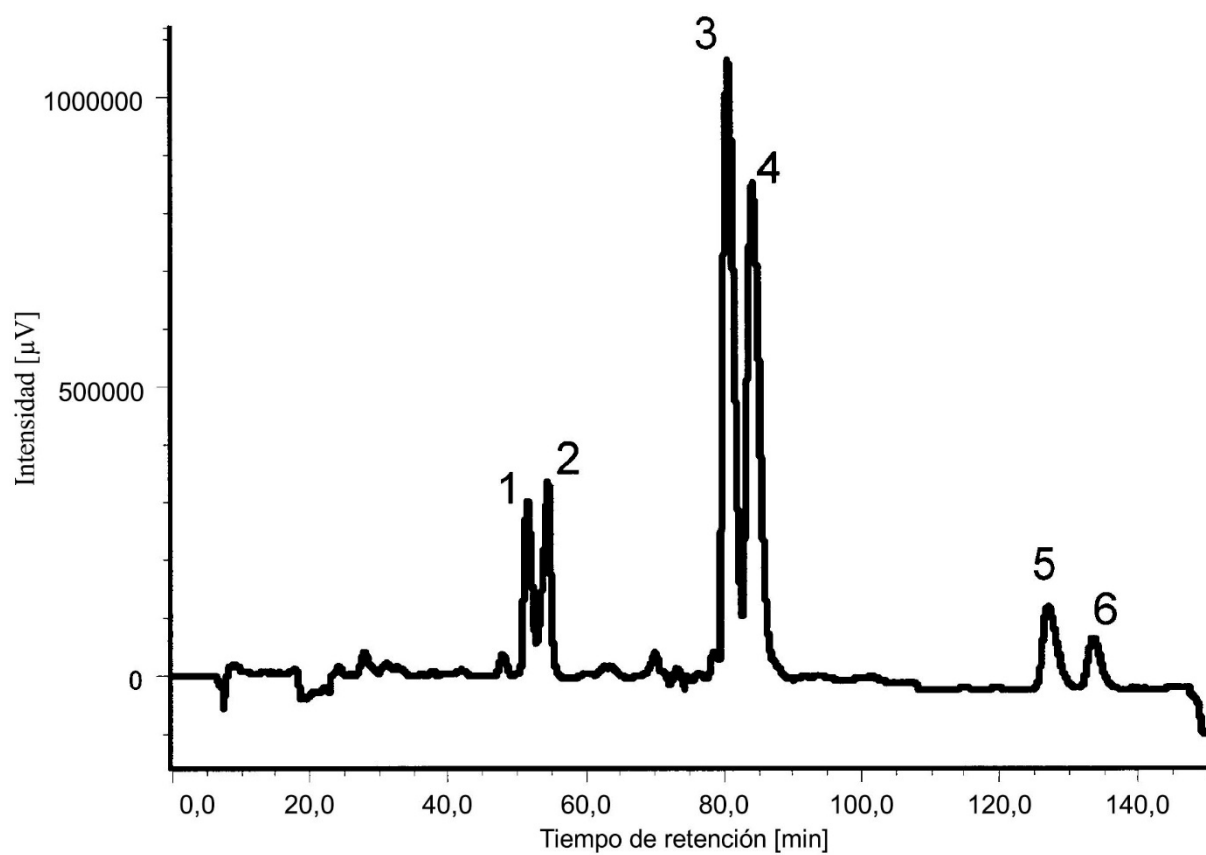


Figura 4

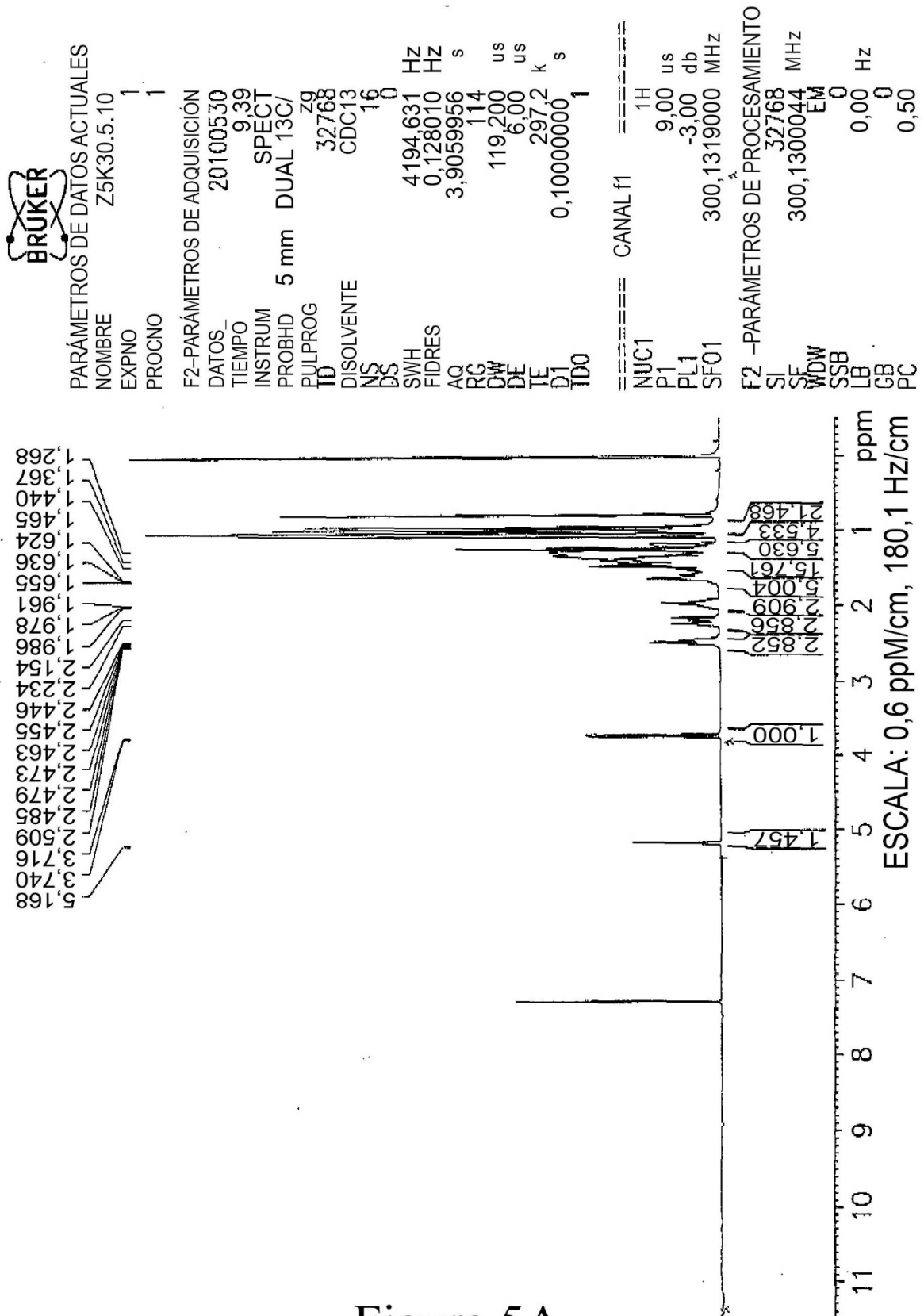
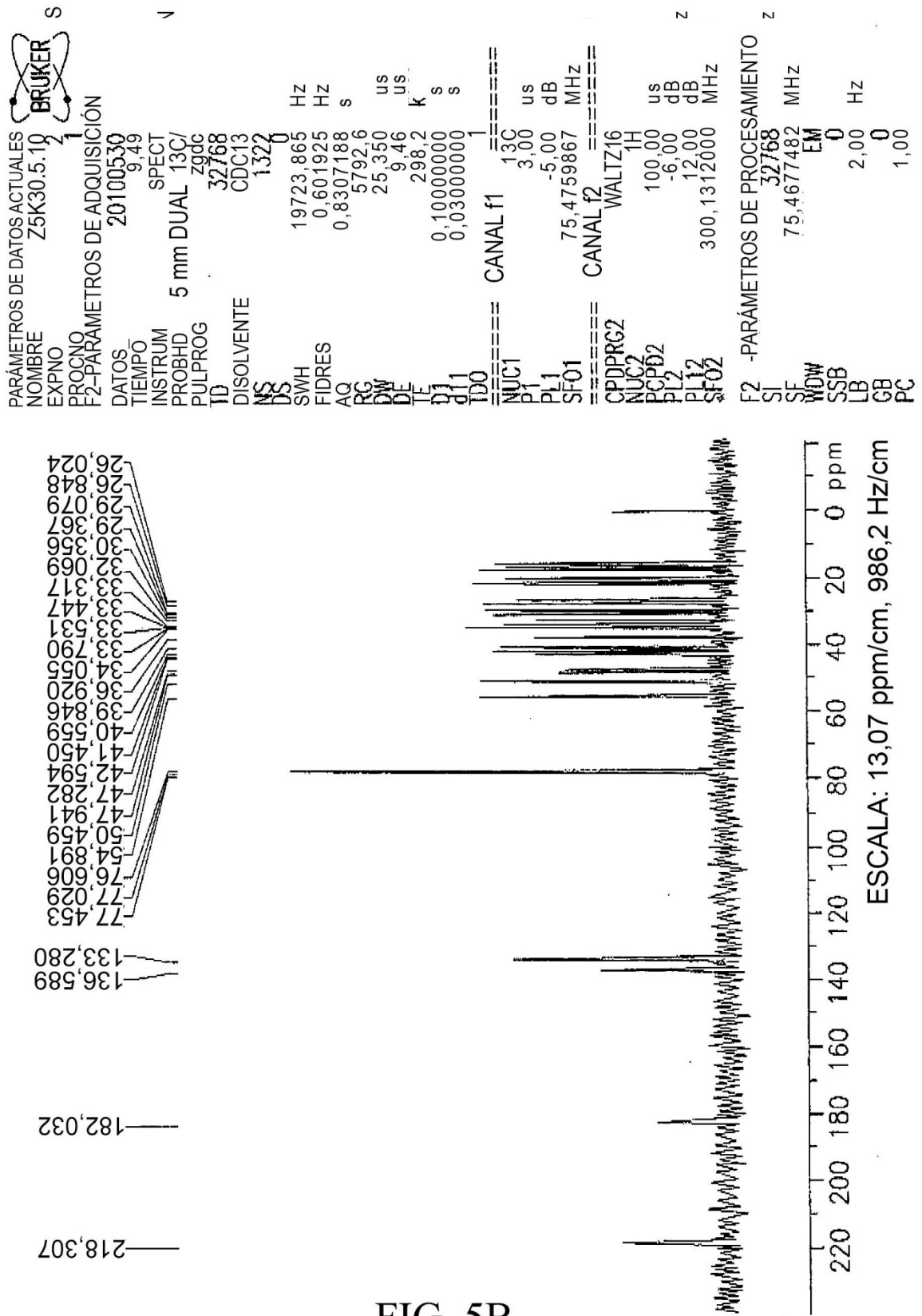


Figura 5A



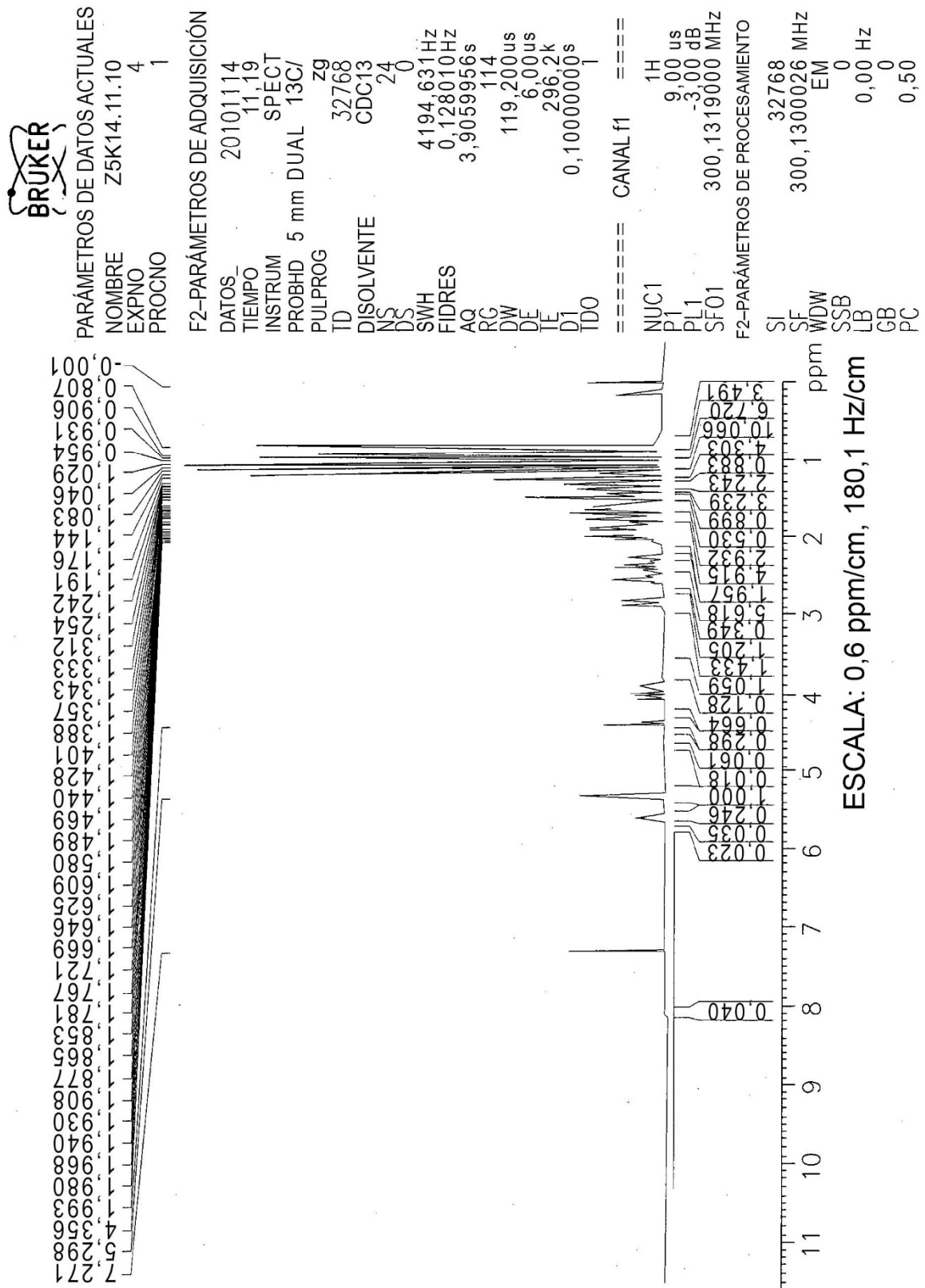
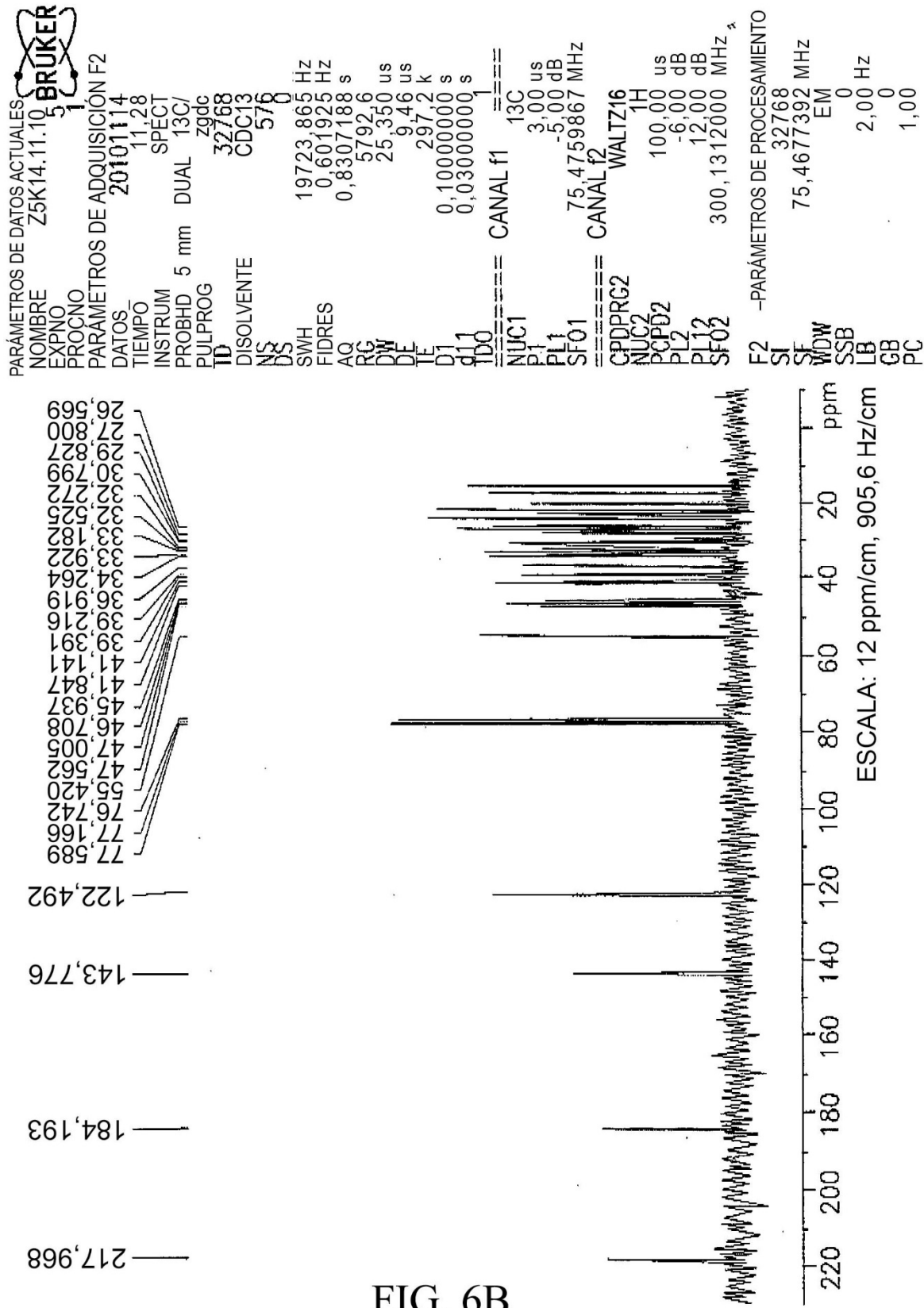


FIG. 6A



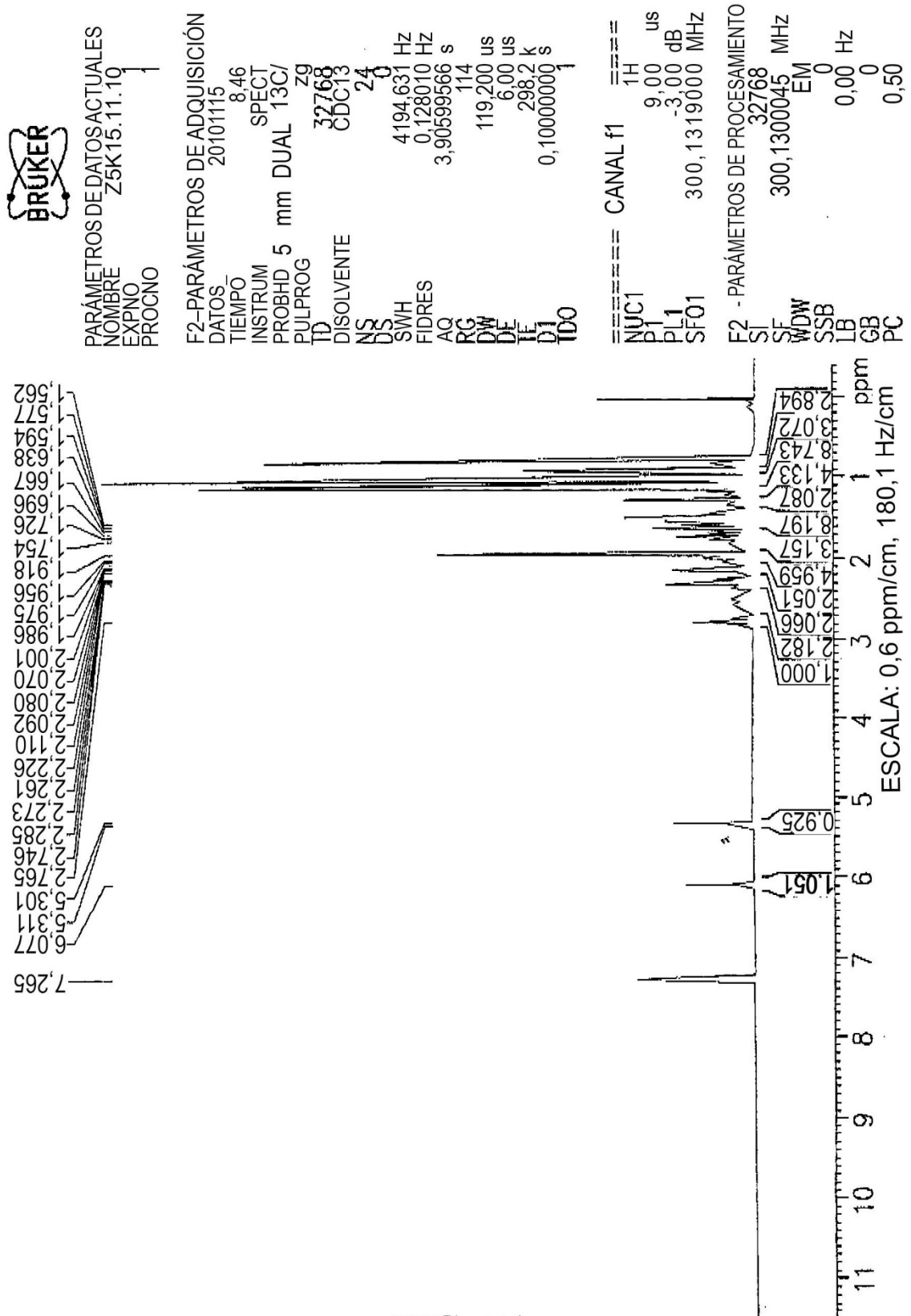


FIG. 7A

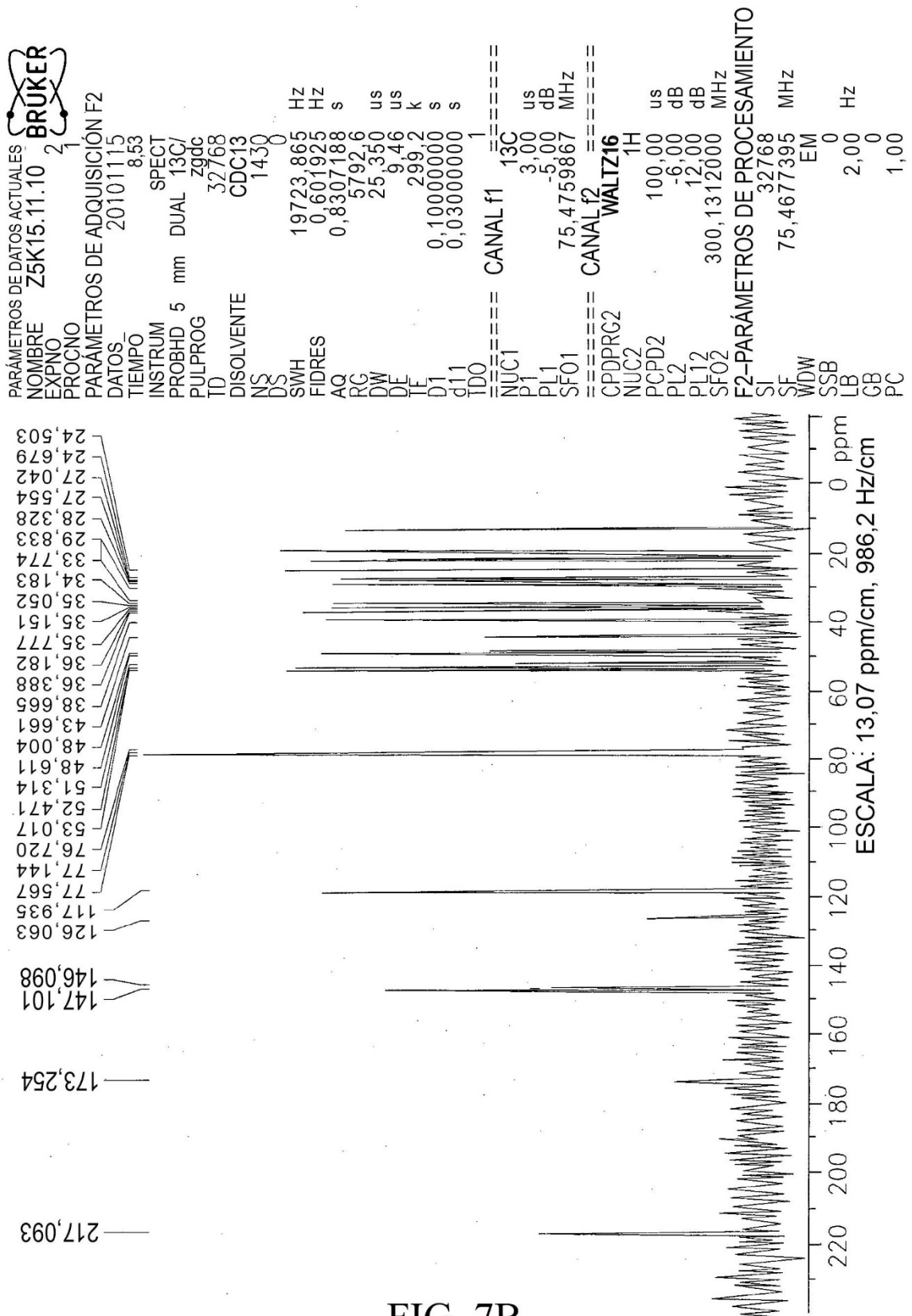


FIG. 7B

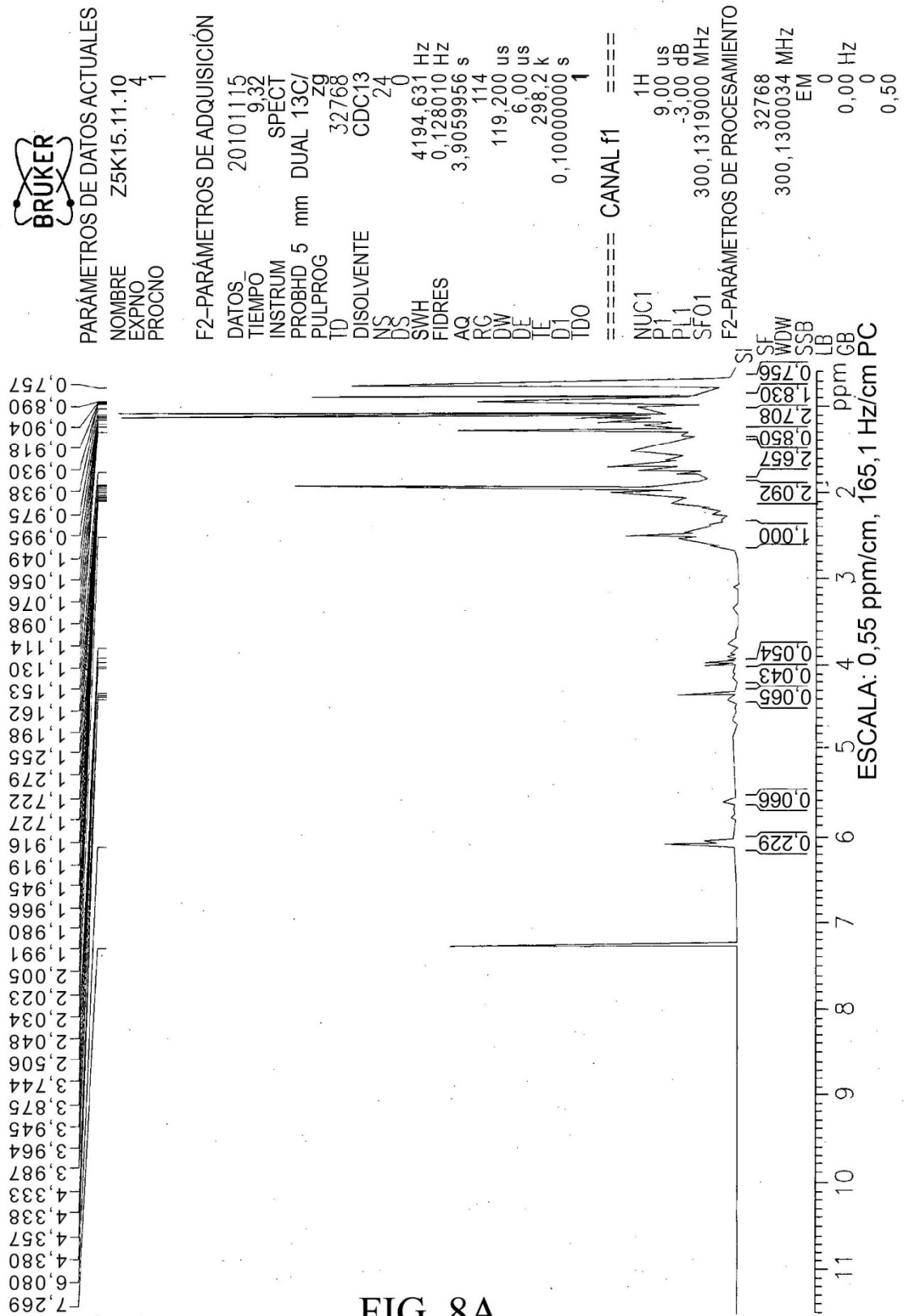


FIG. 8A

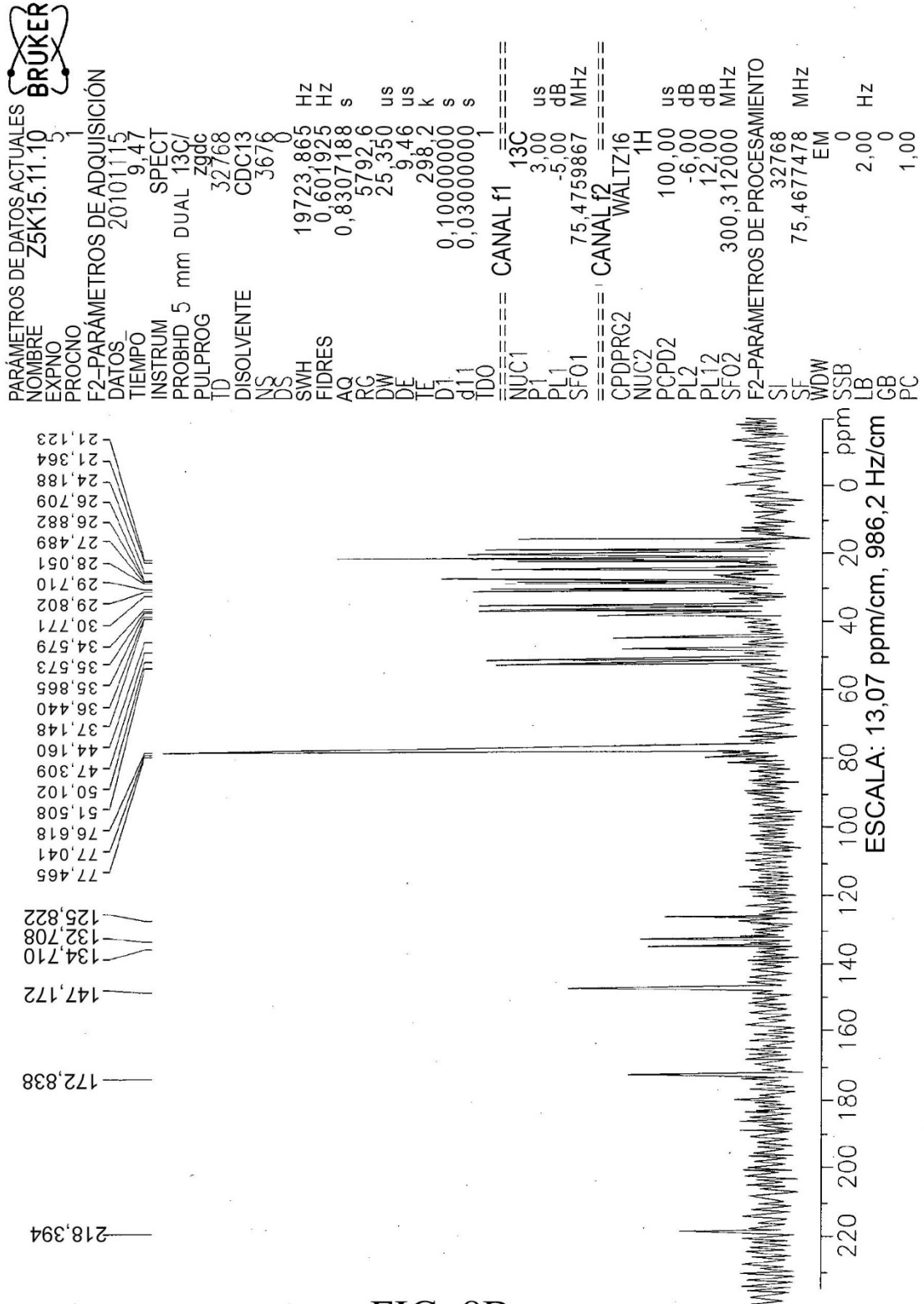


FIG. 8B

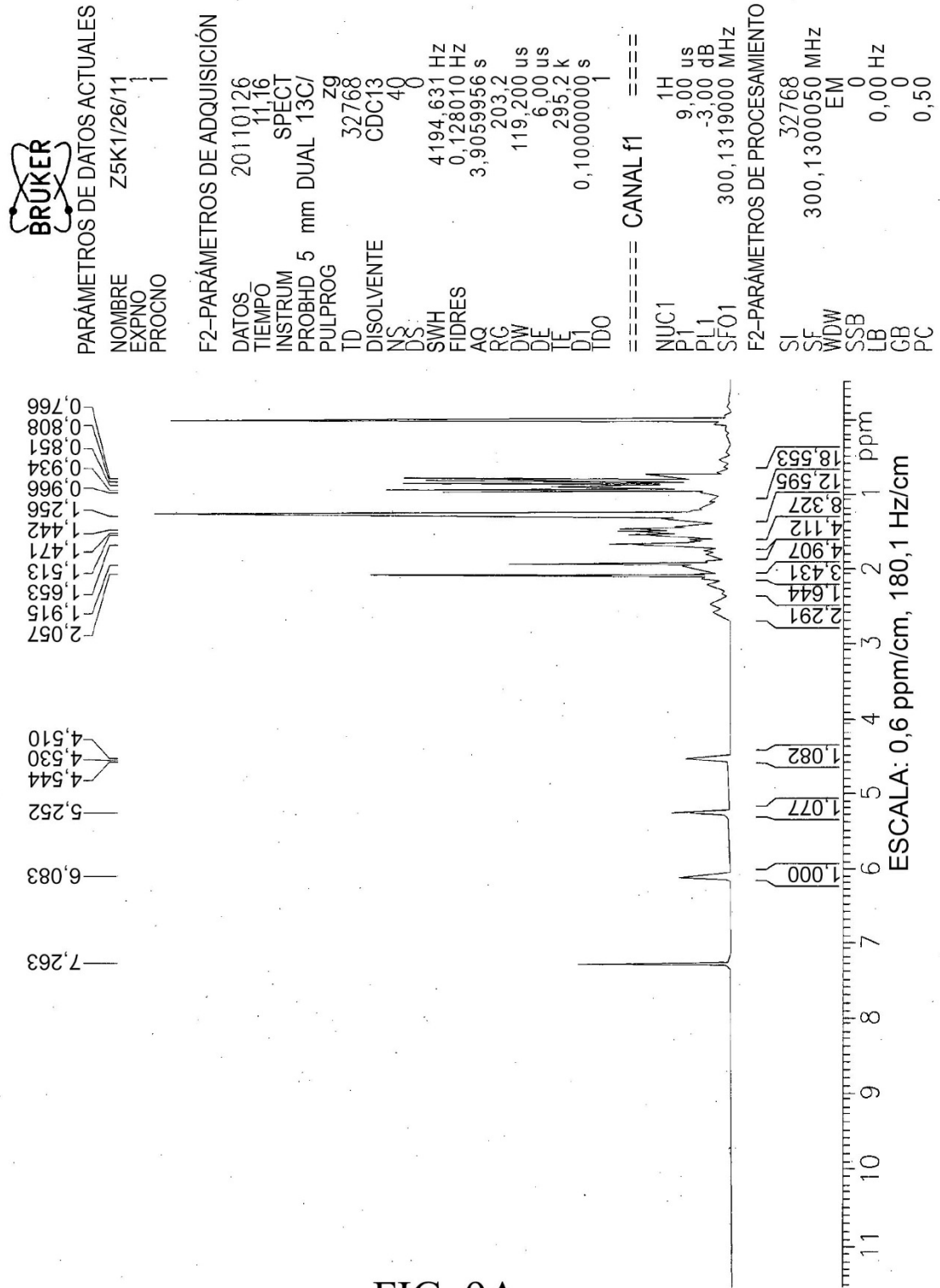


FIG. 9A

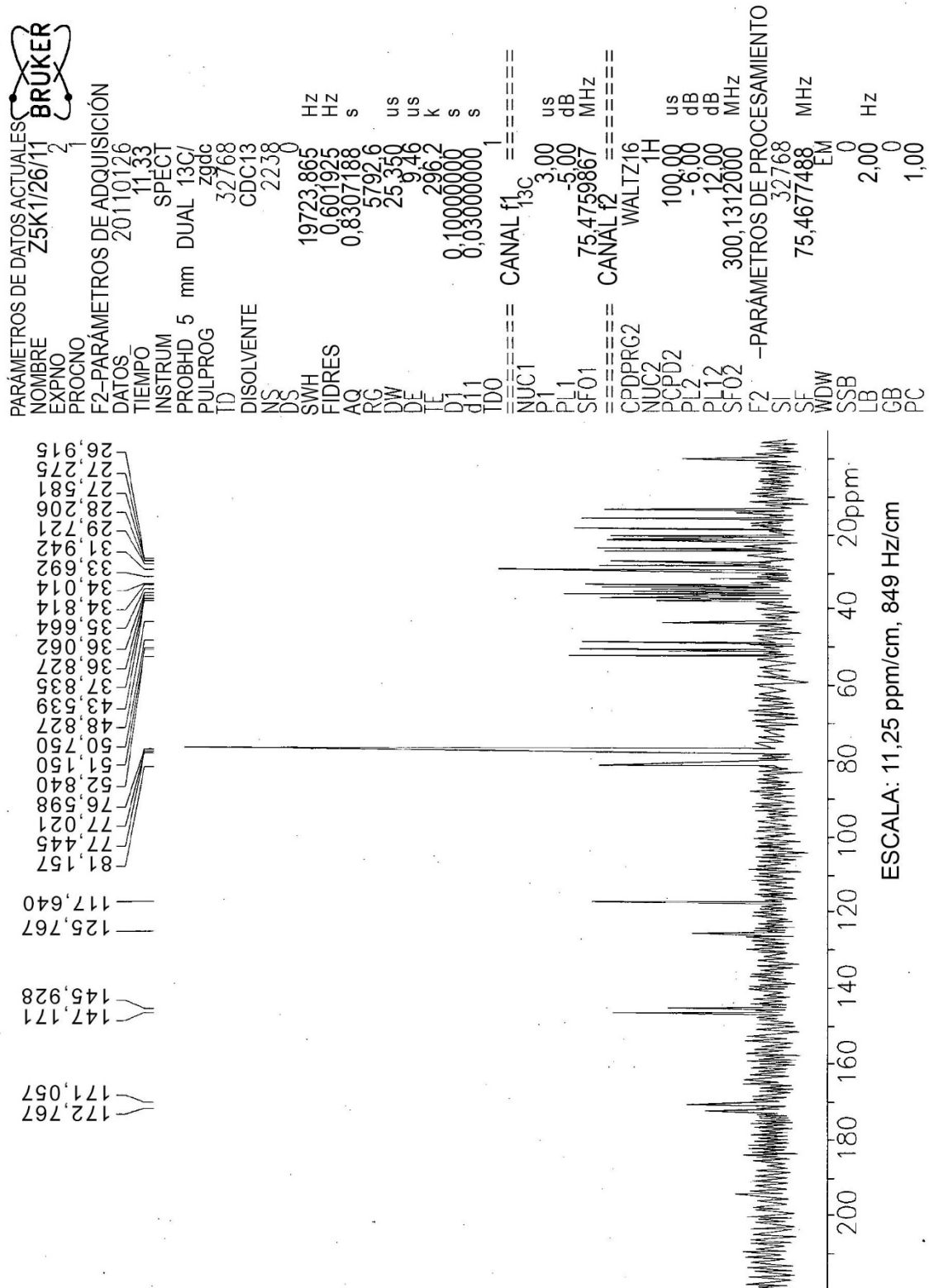


FIG. 9B

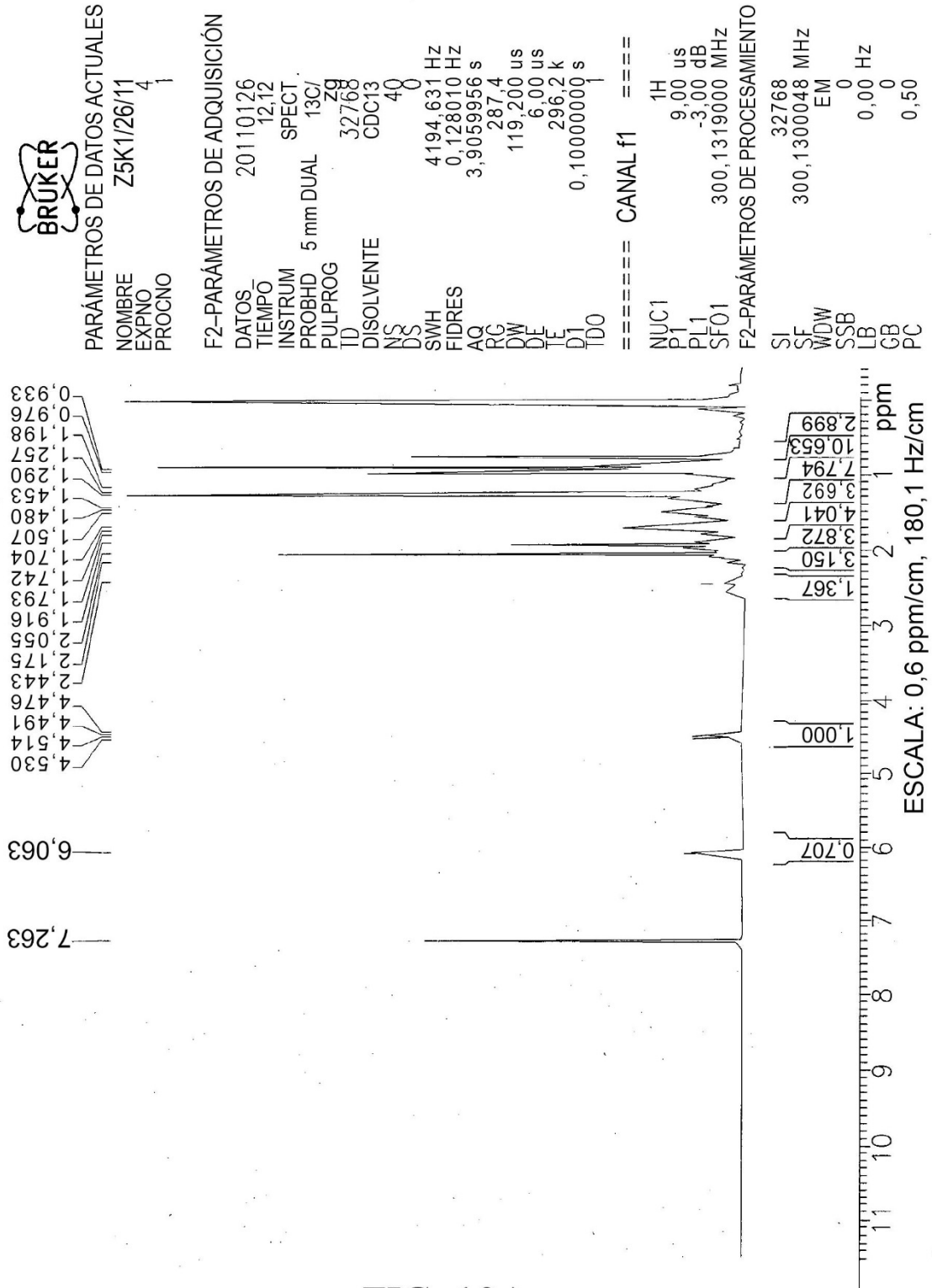


FIG. 10A

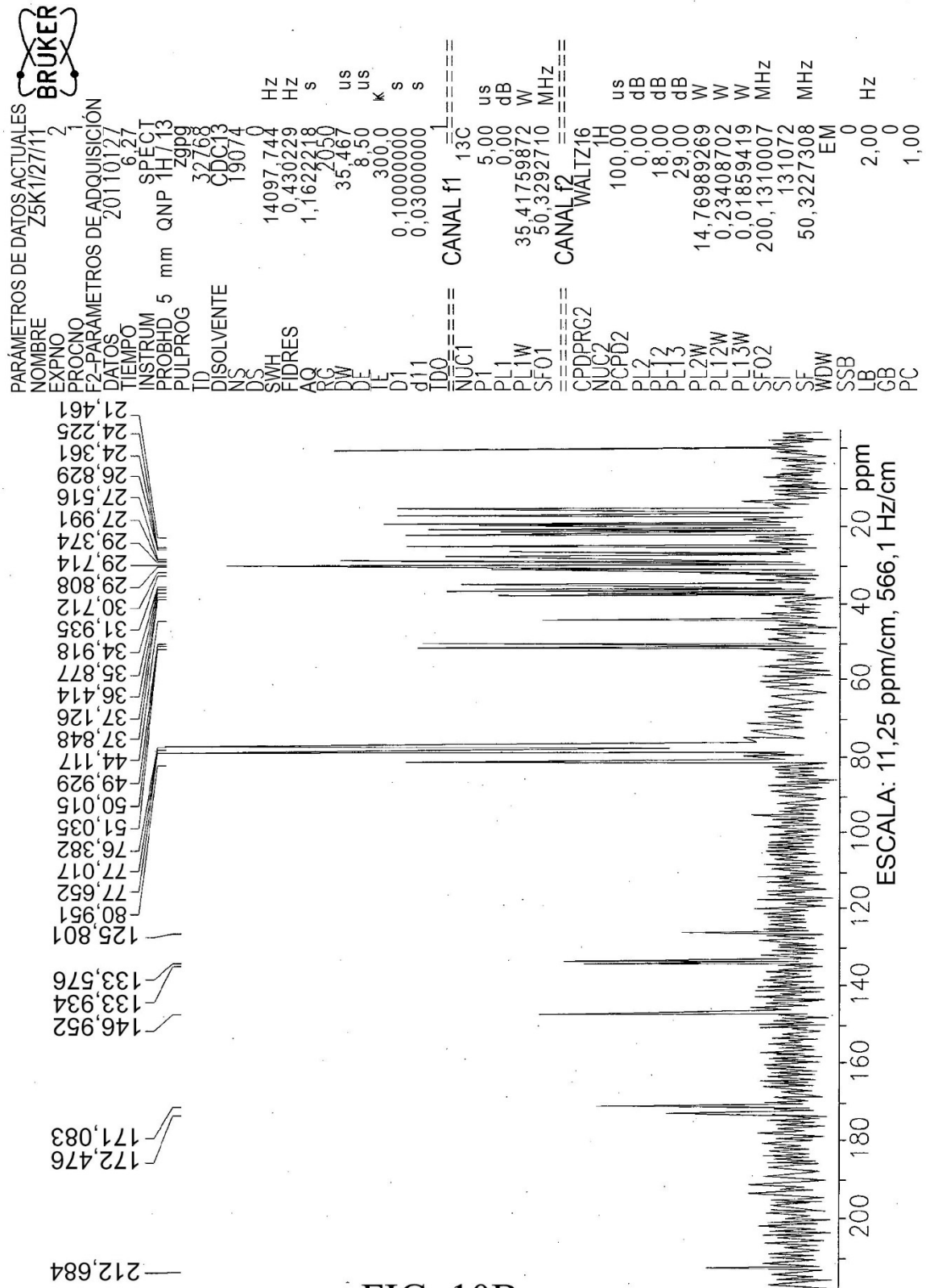


FIG. 10B

Figura 11A



Figura 11B

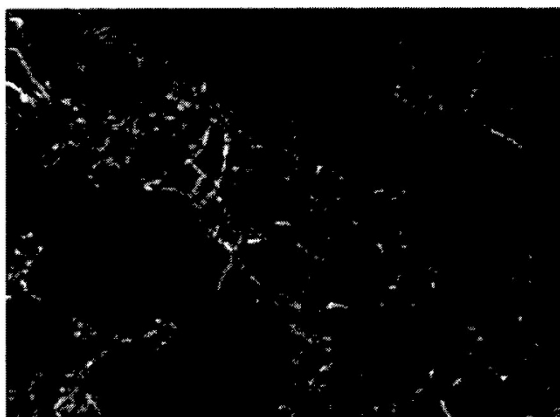


Figura 11C

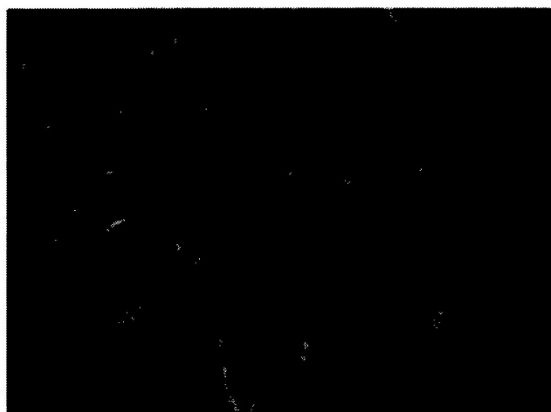


Figura 12A

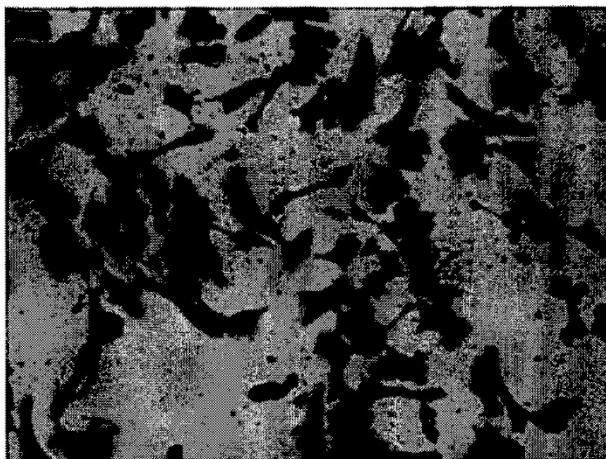


Figura 12B



Figura 12C



Figura 13A

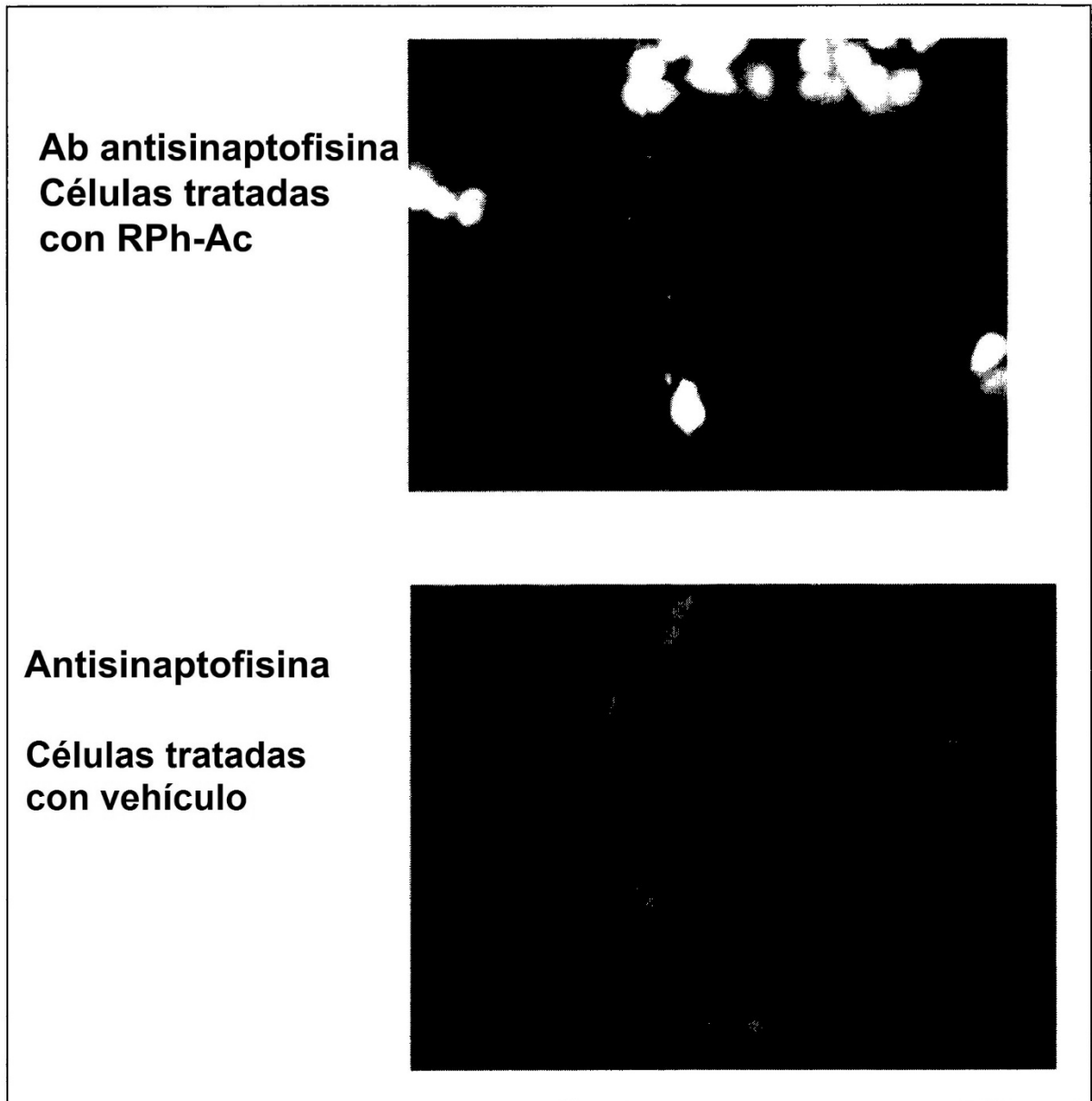


Figura 13B

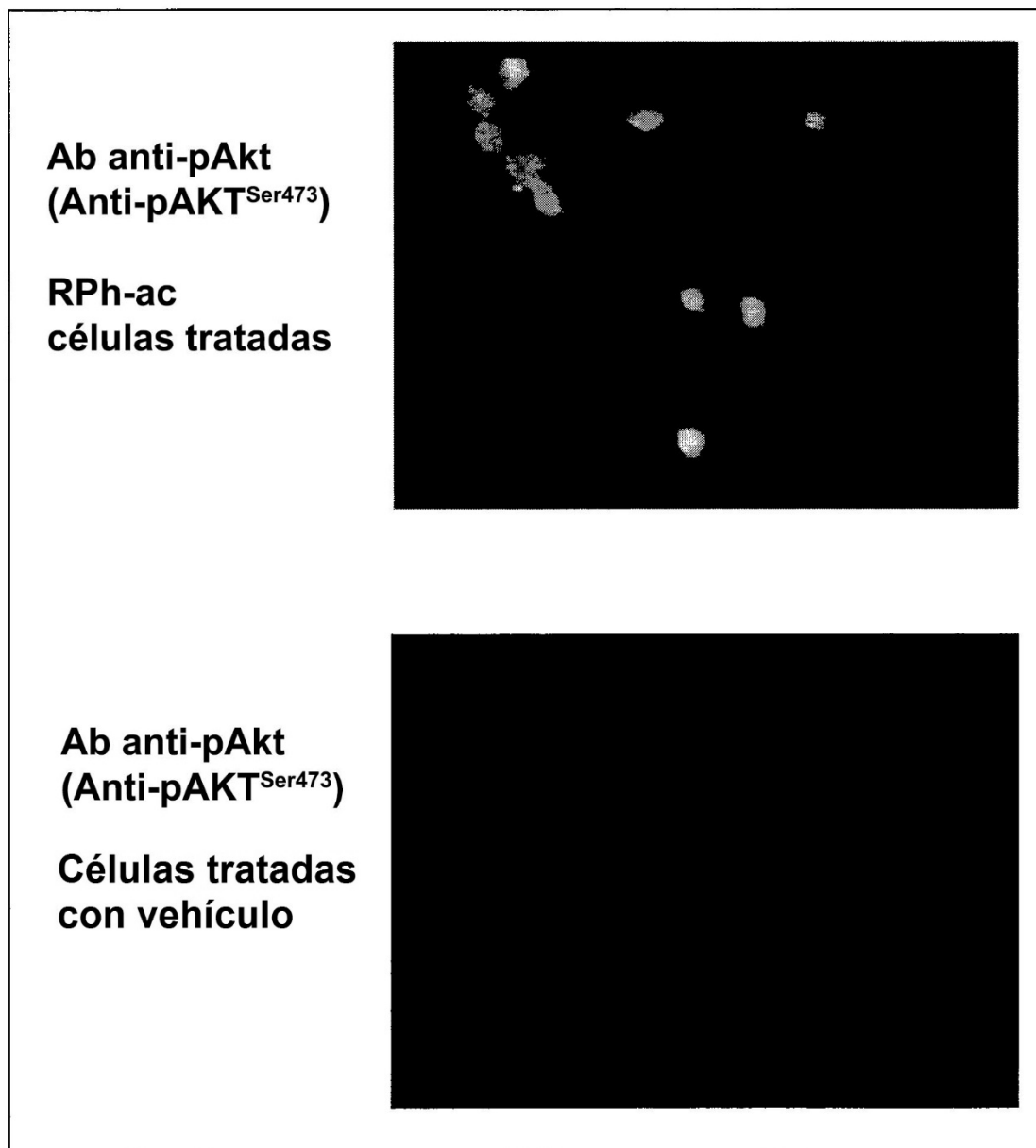
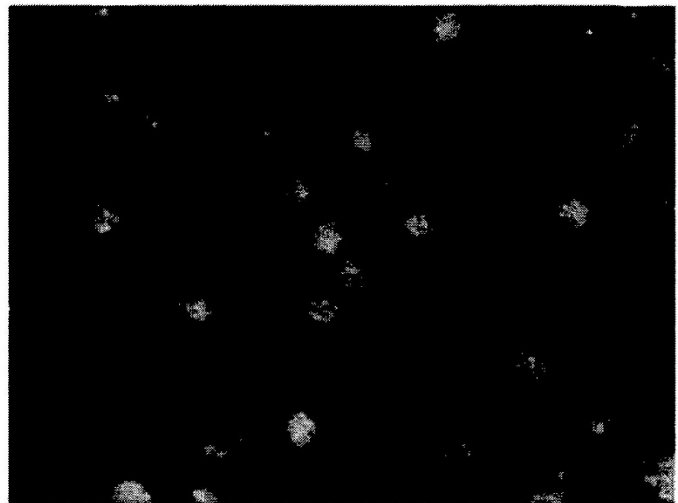


Figura 13C

**Ab anti-Phospho-GSK
3-beta
(Anti-pGSK3-beta^{Ser9})**

**RPh-ac
Células tratadas**



**Ab anti-Phospho GSK
3-beta
(Anti-pGSK3-beta^{Ser9})**

**Células tratadas
con vehículo**



Figura 14A

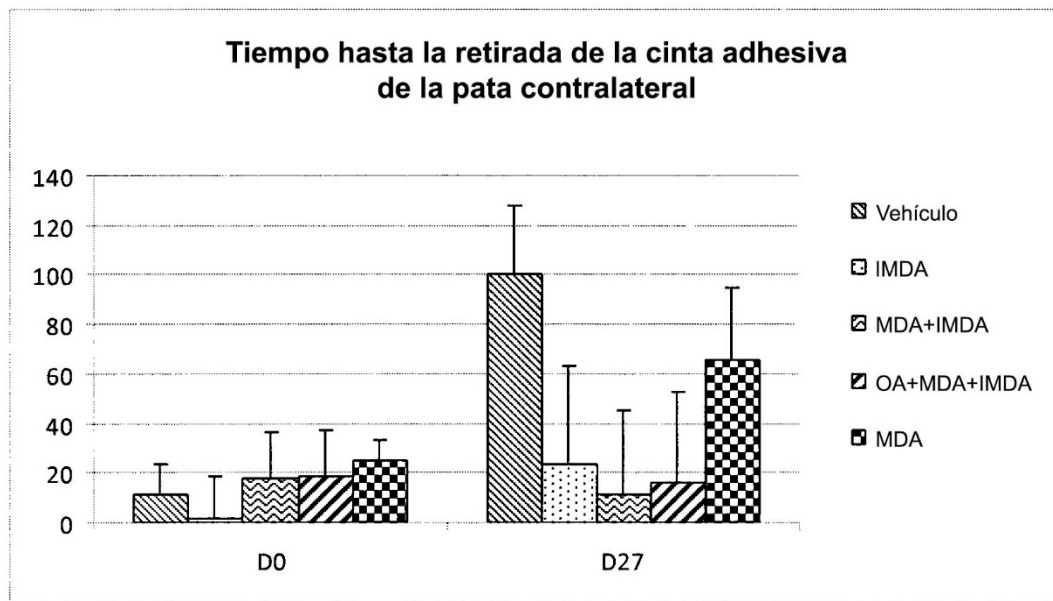
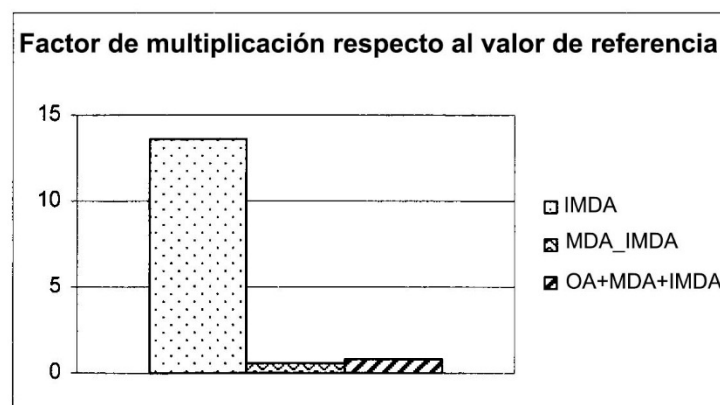


Figura 14B



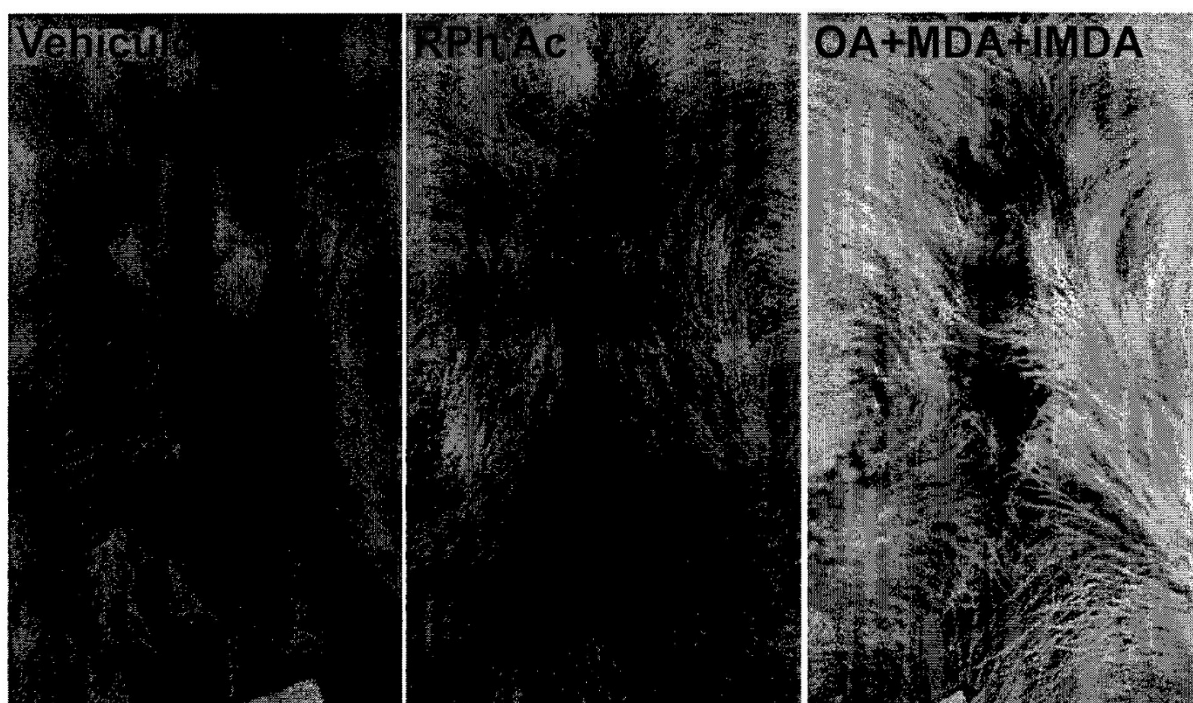


Figura 15