

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 033**

51 Int. Cl.:

A61K 36/22 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2010 PCT/IL2010/000184**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10100651**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2010 E 10710912 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2403512**

54 Título: **Composiciones de mirceno polimérico**

30 Prioridad:

04.03.2009 US 157216 P

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

28.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HAZAN, ZADIK y
AMSELEM, SHIMON**

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 739 033 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 de mirceno polimérico

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a fracciones aisladas de almáciga y su uso terapéutico. Más en particular, la invención se refiere a composiciones que comprenden una fracción aislada de mirceno polimérico y formulaciones que mantienen la actividad biológica del polímero activo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 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.

25 La publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2005/0238740 y el documento WO 03/092712 divulgan que determinadas fracciones extraídas de la resina de mástique presentan actividades antimicrobianas y contra la proliferación celular. De acuerdo con la divulgación, un primer extracto (denominado "fracción total" o "extracto completo") contiene todos los compuestos de la almáciga, excepto la resina polimérica; un segundo extracto es una fracción ácida que contiene todos los ácidos triterpénicos de la fracción total; y un tercer extracto es una fracción neutra que contiene todos los demás terpenos de la fracción total. Adicionalmente se divulga un aceite esencial obtenido por destilación que contiene monoterpenos, entre otros, β -mirceno. La solicitud divulga formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las fracciones totales, ácidas o neutras mencionadas anteriormente combinadas opcionalmente con el aceite esencial, o equivalentes sintéticos del mismo, o que comprenden productos de componentes aislados o equivalentes sintéticos de los mismos, así como el uso de los mismos en procedimientos para el tratamiento de infecciones microbianas, incluyendo *H. pylori*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, e hiperproliferación celular.

40 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*.

50 La solicitud de patente EP n.º 1520585 divulga el uso de un producto obtenido de una planta del género *Pistacia* para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer. De acuerdo con la divulgación, los aceites esenciales destilados de hojas, ramitas, frutos, frutos secos y flores de diferentes especies de *Pistacia* contienen un gran número de compuestos de terpenos monoméricos en proporciones variables, entre otros, β -mirceno. La solicitud divulga además que los aceites tienen actividad contra determinadas líneas de células tumorales tal como los adenocarcinomas de colon y ovario, y que el acetato de bornilo era el único componente encontrado que tenía actividad antineoplásica.

55 La publicación de la solicitud de patente internacional n.º WO 2005/112967 divulga la purificación a partir del mástique de un compuesto antineoplásico que tiene efectos antiproliferativos, que se encuentra en una fracción soluble obtenida suspendiendo mástique en un disolvente seleccionado de un hidrocarburo alifático no ácido, una

- solución acuosa que contiene al menos un 25 % de un hidrocarburo alifático, no ácido y soluble en agua, o una combinación de los mismos, y retirando la fracción insoluble. La solicitud divulga además un procedimiento para tratar células cancerosas que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una fracción de resina de almáciga que inhibe el crecimiento de células cancerosas. De acuerdo con la divulgación, el compuesto antineoplásico es eficaz contra diversos tipos de células cancerosas, incluyendo las células cancerosas de colon humano.
- 5
- 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). De acuerdo con la divulgación, el polímero tiene una amplia distribución de pesos moleculares, es decir, de 20 000 a 100 000 Da, se forma a partir de unidades monoméricas de 136 Da, y tiene la estructura de 1,4-poli- β -mirreno, con configuraciones *cis* y *trans* en una proporción de 3:1. Los autores afirman que su divulgación es el primer informe de un polímero natural de un monoterpeno.
- 10
- 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 -mirreno como uno de los compuestos principales.
- 15
- Marner *et al.* (1991) divulgan la identificación de diversos triterpenoides de almáciga de *P. lentiscus* (Marner *et al.* (1991) *Phytochemistry*, 30, 3709-3712).
- La patente de EE. UU. n.º 5.506.406 divulga un aceite de mástique producido disolviendo mástique en un aceite o grasa, y rellenando una cápsula blanda que opcionalmente contiene además una sustancia anfipática tal como quitina o quitosano. De acuerdo con la divulgación, la cápsula es eficaz para eliminar e inhibir *H. pylori*, y para reducir el olor de las heces. La patente de EE. UU. n.º 5.637.290 divulga un producto de higiene bucal que comprende la combinación de una pasta de dientes y un ingrediente seleccionado de mástique natural, aceite de mástique extraído y agentes de aceite de mástique sintéticos. También se divulga el uso de mástique para incorporar en lociones bronceadoras, productos capilares y cosméticos.
- 20
- La patente de EE. UU. n.º 6.623.728 divulga composiciones cosméticas de emulsión para el cuidado de la piel que comprenden de aproximadamente un 0,001 % en peso hasta aproximadamente un 10 % en peso de goma de lentisco solubilizada; un disolvente volátil miscible en agua; y un vehículo cosméticamente aceptable. De acuerdo con la divulgación, la emulsión es preferentemente una emulsión de aceite en agua, y los disolventes preferentes incluyen etanol, metanol propanol, alcohol isopropílico y mezclas de los mismos. De acuerdo con la divulgación, se usan los mismos tipos de disolventes para obtener la goma de lentisco solubilizada.
- 25
- La patente de EE. UU. n.º 6.811.769 divulga una composición oral que comprende un extracto de aceite de mástique, tal como el preparado con aceite de oliva o aceite de palma; y un antiflogístico, tal como ácido glicirrónico. De acuerdo con la divulgación, la composición tiene acción antibacteriana contra bacterias relacionadas con la periodontitis y contra bacterias relacionadas con la caries dental.
- 30
- La patente de EE. UU. n.º 7.294.651 divulga el uso de compuestos isoprenoides, entre otros, compuestos de terpenos para inhibir la producción de exoproteínas de bacterias grampositivas, tales como la toxina 1 del síndrome de choque tóxico producida por *S. aureus*. De acuerdo con la divulgación, los terpenos adecuados pueden ser cíclicos o acíclicos, saturados o insaturados, y también incluyen politerpenos. También se divulga el uso de dichos compuestos para preparar composiciones que se pueden incorporar en soluciones acuosas, tales como formulaciones de limpieza vaginal.
- 35
- La patente de EE. UU. n.º 4.564.718 divulga la preparación de polímeros terminados funcionalmente, denominados "cauchos líquidos" que tienen temperaturas de transición vítrea sustancialmente menores que la temperatura ambiente, mediante la polimerización de un terpeno o un derivado de oxígeno del mismo que tiene un doble enlace o un doble enlace conjugado disponible para la polimerización. con un iniciador que proporciona la terminación funcional deseada. De acuerdo con la divulgación, los polímeros tienen preferentemente un peso molecular de 500 a 20 000 y los monoterpenos acíclicos preferentes para la preparación de los mismos son, entre otros, β -mirreno. La patente divulga la preparación de mirreno polimérico de peso molecular de aproximadamente 2000 y de aproximadamente 4000. La patente divulga además que los polímeros de la invención se pueden hacer reaccionar además con otros reactivos para proporcionar elastómeros, selladores o adhesivos, o se pueden usar como agentes de endurecimiento del caucho. Se divulga además la preparación de polimirreno terminado en hidroxilo a partir de mirreno y el uso del mismo para preparar un elastómero de poliuretano.
- 40
- Newmark *et al.* *J. Polymer Sci.* 26, 71-77 (1988) divulgan la síntesis de polimirreno que tiene un peso molecular observado de 87 000 y un peso molecular calculado de 46 000.
- 45
- La patente de EE. UU. n.º 4.374.957 divulga un polímero tribloque lineal elastomérico termoplástico pegajoso correspondiente a la fórmula A-B-A, en el que A es un bloque homopolimérico lineal no elástico de un hidrocarburo aromático monovinílico que tiene un peso molecular promedio entre 10 000 y 60 000 y una temperatura de transición vítrea por encima de 70 °C., y en el que B es un bloque homopolimérico elastomérico de mirreno que tiene un peso
- 50
- 55

molecular promedio entre 50 000 y 200 000 y una temperatura de transición vítrea por debajo de aproximadamente -40 °C.

5 La patente de EE. UU. n.º 5.759.569 divulga artículos compostables biodegradables que comprenden al menos parcialmente determinados polímeros *trans*, en los que los polímeros tienen un peso molecular promedio en peso de al menos aproximadamente 20 000 y se obtienen polimerizando un componente monomérico que comprende: (1) de aproximadamente un 70 a un 100 % en moles de 1,3-dienos, entre otros, β -mirceno; y (2) hasta aproximadamente un 30 % en moles de otros comonómeros compatibles. De acuerdo con la divulgación, los artículos incluyen, entre otros, materiales de acondicionamiento; artículos absorbentes desechables (por ejemplo, pañales, compresas sanitarias); artículos de ropa tales como ropa de protección, paños quirúrgicos, batas quirúrgicas, sábanas quirúrgicas; telas, tejidas y no tejidas; esponjas quirúrgicas, aplicadores de tampones, jeringas desechables y envases.

Las patentes de EE. UU. n.ºs 7.232.872 y 7.214.750 divulgan un procedimiento de polimerización que comprende poner en contacto uno o más monómeros, entre otros, mirceno, uno o más ácidos de Lewis, uno o más iniciadores, y un diluyente que comprende uno o más hidrofluorocarbonos en un reactor.

15 La publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2007/0179260, la patente de EE. UU. N.º 7.417.103 y el documento EP 1721914 divulgan polímeros a base de 3,4-isopreno con alta regiorregularidad y un procedimiento para producir los mismos. De acuerdo con estas divulgaciones, el peso molecular promedio en número del polímero es de 5000 a 6 000 000, y el polímero también puede incluir unidades de 1,4-isoprenos tales como mirceno. De acuerdo con la divulgación, el polímero es adecuado para su uso como material plástico debido a su durabilidad mecánica y térmica.

El documento JP 63179908 divulga la preparación de un polímero de mirceno que tiene un alto contenido de enlaces 1,4, peso molecular alto y amplia distribución de pesos moleculares, mediante la polimerización de mirceno en un disolvente orgánico inerte usando un catalizador de metales de tierras raras de la serie del lantano.

25 Khan *et al.* (Journal of Ethnopharmacology, 1, (2006), 68-73) divulgan el uso de Khamira Abresham Hakim Arshad Wala, que incluye Mastagi, en el tratamiento del deterioro cognitivo.

Yousuf *et al.* (Journal of Ethnopharmacology 99, (2005), 179-184) estudian el efecto de Khamira Abresham Uood Mastagiwala sobre la actividad de enzimas antioxidantes, glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y el contenido de glutatión (GSH) y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Uno de los constituyentes de Khamira Abresham Uood Mastagiwala es el mastagi.

30 La técnica anterior no contiene ninguna enseñanza o sugerencia del uso de una fracción aislada de mirceno polimérico, ya sea derivado de mástique o sintetizado químicamente, como ingrediente activo en una composición farmacéutica o en una aplicación terapéutica. La técnica anterior no enseña ni sugiere el uso de una fracción aislada de mirceno polimérico en una composición para tratar afecciones neurológicas o trastornos de la piel.

SUMARIO DE LA INVENCION

35 La presente invención proporciona, entre otras, composiciones farmacéuticas que consisten en formas poliméricas del compuesto monoterpénico conocido como mirceno, que presentan una variedad de actividades biológicas beneficiosas que se pueden explotar para aplicaciones terapéuticas, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Más específicamente, ahora se divulga que las composiciones que consisten en fracciones aisladas de mirceno polimérico, incluyendo el sintetizado químicamente y el derivado de fuentes vegetales tal como la almáciga, tienen actividad en la neuroprotección, la regeneración de tejidos y la reparación de heridas y tejidos.

Las composiciones divulgadas en el presente documento se pueden preparar mediante extracción con disolvente de determinado material vegetal, tal como almáciga, para obtener fracciones aisladas que son solubles en disolventes tanto polares como no polares, y se han eliminado de ellas diversos compuestos terpénicos monoméricos que interfieren con la actividad biológica deseada.

45 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. La presente invención también se ha ejemplificado tanto con el mirceno polimérico aislado de una fuente natural, es decir, el mástique de resina de árbol, como con el mirceno polimérico sintetizado químicamente que tiene el peso molecular en el mismo intervalo y estructura química que el del polímero correspondiente aislado de mástique.

55 Además, las enseñanzas de la presente invención son en particular sorprendentes e inesperadas con respecto a las enseñanzas que divulgan el uso de fracciones de extracto de almáciga de las que se ha retirado el mirceno polimérico. Además, la técnica anterior afirma que las fracciones poliméricas derivadas de mástique no son terapéuticamente útiles, y que la presencia de mirceno polimérico en composiciones terapéuticas en realidad inhibe las actividades biológicas beneficiosas y la biodisponibilidad de los compuestos activos. La técnica anterior enseña

que los compuestos activos en la almáciga se corresponden con diversas moléculas de tipo terpeno de bajo peso molecular, entre otras, el mirceno monomérico. Sin embargo, los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente, y contrariamente a las enseñanzas de la técnica anterior, que el mirceno monomérico, pequeñas formas oligoméricas de mirceno y otros terpenos determinados de bajo peso molecular interfieren con la actividad del mirceno polimérico para inducir la diferenciación celular y la bloquean.

Sin desear estar ligado a ninguna teoría o mecanismo de acción en particular, la actividad del mirceno polimérico para la inducción de la diferenciación de células neuronales, como se divulga en el presente documento, hace que la presente invención sea útil para reformar las uniones interneuronales y superar la comunicación interneuronal defectuosa en cerebro y tejido neural afectados por patologías asociadas con una formación sináptica inadecuada. Esta patología subyace a muchas patologías del sistema nervioso, incluyendo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. La invención es además útil para promover la cicatrización y el rejuvenecimiento de un gran número de células y tejidos.

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

Se debe entender explícitamente que el alcance de la presente invención no incluye el mirceno en su forma monomérica, tal como el β -mirceno y el α -mirceno, como ingredientes activos de las fracciones y composiciones divulgadas en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, β -mirceno se refiere a 7-metil-3-metilen-1,6-octadieno y α -mirceno se refiere al isómero estructural 2-metil-6-metilen-1,7-octadieno.

Se debe entender además que la actividad biológica de las fracciones y composiciones divulgadas en el presente documento se inhibe por la presencia de determinadas formas oligoméricas pequeñas y monoméricas de diversos terpenos.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona una fracción aislada de almáciga, en el que la fracción se caracteriza por que es soluble en al menos un disolvente orgánico polar y en al menos un disolvente orgánico no polar, y en el que dicha fracción está sustancialmente desprovista de compuestos que son solubles en dicho disolvente orgánico polar pero insolubles en dicho disolvente orgánico no polar.

La fracción aislada 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;
- (e). aislar una fracción soluble en dicho disolvente orgánico no polar; y
- (f). opcionalmente retirar dicho disolvente orgánico no polar;

en el que las etapas (d) a (f) pueden preceder a las etapas (a) a (c).

Las etapas (a) a (c) se pueden llevar a cabo antes de las etapas (d) a (f); o las etapas (d) a (f) se pueden llevar a cabo antes de las etapas (a) a (c). En algunos modos de realización particulares, (a) a (c) y/o las etapas (d) a (f) se repiten para una multiplicidad de ciclos.

En un modo de realización particular, cualquiera o ambas de las etapas (c) y (f) comprenden retirar el disolvente por un medio seleccionado del grupo que consiste en evaporación rotatoria, aplicación de alto vacío y una combinación de los mismos. En un modo de realización particular, el procedimiento comprende además la etapa de fraccionar por tamaño la fracción obtenida por dicho procedimiento.

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.

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 metiletílico, 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.

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

5 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 modos de realización particulares, 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.

10 En modos de realización particulares, el disolvente orgánico no polar se selecciona de pentanos, hexanos, heptanos, octanos, nonanos, decanos, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, benceno, tolueno, xileno e isómeros y mezclas de los mismos.

En modos de realización particulares, 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.

15 En modos de realización particulares, el disolvente orgánico no polar es hexano.

En un modo de realización particular, el disolvente orgánico polar comprende etanol y el disolvente orgánico no polar comprende hexano.

20 En un modo de realización particular, la composición está sustancialmente desprovista de compuestos terpénicos que sean solubles en dicho disolvente orgánico polar e insolubles en dicho disolvente orgánico no polar. En un modo de realización particular, los compuestos terpénicos son compuestos terpénicos monoméricos. Los compuestos terpénicos se pueden seleccionar de β -mirceno, α -mirceno, *cis*- α -ocimeno, dihidromirceno, limoneno, α -pineno, β -pineno y combinaciones de los mismos.

25 En un modo de realización particular, la composición comprende de aproximadamente un 0,01 hasta aproximadamente un 25 % (p/p) de la fracción aislada de almáciga, en base al peso total de la composición. Por tanto, la composición puede comprender de aproximadamente un 0,01 hasta aproximadamente un 12 % (p/p) de la fracción aislada de almáciga, en base al peso total de la composición.

La fracción aislada de goma de lentisco puede comprender mirceno polimérico.

30 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que consiste en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y de un 0,01 a un 25 % (p/p) de mirceno polimérico, en base al peso total de la composición.

35 El mirceno polimérico se puede seleccionar del grupo que consiste en β -mirceno polimérico (poli- β -mirceno), α -mirceno polimérico (poli- α -mirceno), copolímeros de mirceno y combinaciones de los mismos, o del grupo que consiste en 1,4-poli- β -mirceno, 3,4-poli- β -mirceno, 1,2-poli- β -mirceno y combinaciones de los mismos. El mirceno polimérico puede comprender un isómero de mirceno seleccionado del grupo que consiste en un isómero *cis*, un isómero *trans* y combinaciones de los mismos. El 1,4-poli- β -mirceno se puede seleccionar del grupo que consiste en *cis*-1,4-poli- β -mirceno, *trans*-1,4-poli- β -mirceno y combinaciones de los mismos. El mirceno polimérico puede comprender *cis*-1,4-poli- β -mirceno. El mirceno polimérico puede tener una conformación cíclica o una conformación ramificada.

40 El mirceno polimérico puede tener un grado de polimerización en el intervalo de al menos aproximadamente 6 hasta aproximadamente 1800, por ejemplo al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 25, o al menos aproximadamente 35. El grado de polimerización puede estar en el intervalo de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 30, o en el intervalo de aproximadamente 30 hasta aproximadamente 500, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 33 hasta aproximadamente 150.

45 El mirceno polimérico puede tener un peso molecular promedio en número de al menos aproximadamente 800. En un modo de realización particular, el peso molecular promedio en número es de al menos 1000, tal como 2000 o 3000. En un modo de realización particular, el peso molecular promedio en número es de al menos 5000. En un modo de realización particular, el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de 1000 a 50 000; al menos 1000 a 10 000; al menos 1000 a 20 000; 5000 a 10 000; 10 000 a 15 000; aproximadamente 5000 a 20 000; 15 000 a 30 000; 25 000 a 40 000; 35 000 a 50 000; e intervalos intermedios de los mismos. En un modo de realización particular, el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 5000 hasta aproximadamente 20 000.

Se debe entender que la composición puede comprender diferentes fracciones de peso molecular de mirceno polimérico, por ejemplo en el intervalo de al menos aproximadamente 800 hasta aproximadamente 100 000, o diversas combinaciones de las mismas. El mirceno polimérico puede tener un índice de polidispersidad menor de 5.

En un modo de realización particular, el mirceno polimérico es el producto de una síntesis química. La síntesis química puede comprender el uso de mirceno monomérico como sustrato. El sustrato puede ser β -mirceno. El sustrato de β -mirceno se puede derivar de una planta.

5 El producto de la síntesis química puede comprender *cis*-1,4-poli- β -mirceno. La síntesis química puede comprender una reacción de polimerización aniónica. La síntesis química puede comprender además disolver el mirceno polimérico obtenido a partir de la misma en un vehículo hidrófobo, tal como al menos un aceite vegetal.

10 La fracción aislada de mirceno polimérico se puede derivar de una fuente natural. Las fuentes naturales incluyen plantas clasificadas en la familia *Anacardiaceae*. Por ejemplo, la goma de lentisco puede ser de una planta clasificada en la familia *Anacardiaceae*. Las plantas adecuadas incluyen aquellas clasificadas en un género seleccionado del grupo que consiste en *Pistacia*, *Pinus*, *Picea*, *Juniperus*, *Alsies*, *Larix*, *Antirrhinum*, *Boswellia*, *Citrus* y *Gynura*. En un modo de realización particular, 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*. En un modo de realización particular, 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. La fuente natural también puede ser una planta clasificada en un género seleccionado del grupo que consiste en *Ocimum*, *Laurus* y *Lavendula*.

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

- (a). poner en contacto material vegetal con al menos un disolvente orgánico polar;
- 20 (b). aislar una fracción que es soluble en al menos un disolvente orgánico polar
- (c). opcionalmente retirar dicho disolvente orgánico polar;
- (d). tratar la fracción soluble obtenida en la etapa (b) o (c) con al menos un disolvente orgánico no polar,
- (e). aislar una fracción soluble en dicho disolvente orgánico no polar; y
- (f). opcionalmente retirar dicho disolvente orgánico no polar;
- 25 en el que las etapas (d) a (f) pueden preceder a las etapas (a) a (c), y en el que las etapas (a) a (c) y las etapas (d) a (f) se pueden llevar a cabo cada una de manera independiente durante varios ciclos para obtener una fracción aislada de mirceno polimérico.

30 En modos de realización particulares, la fracción aislada de mirceno polimérico tiene un grado de pureza de al menos un 80 % (p/p). La fracción aislada de mirceno polimérico puede tener un grado de pureza de al menos aproximadamente un 85 % (p/p). En modos de realización particulares, la fracción aislada de mirceno polimérico tiene un grado de pureza de al menos un 90 % (p/p), o al menos un 95 %.

Específicamente, la fracción aislada de mirceno polimérico puede tener un grado de pureza de al menos un 80 %, y el mirceno polimérico puede tener un grado de polimerización de al menos 6.

35 La fracción aislada de mirceno polimérico también puede tener un grado de pureza de al menos un 90 %, y el mirceno polimérico puede tener un grado de polimerización de al menos 10.

40 La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno, o una mezcla de *cis*-1,4-poli- β -mirceno y *trans*-1,4-poli- β -mirceno, en la que la mezcla comprende al menos un 50 % (p/p) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno. La fracción aislada de mirceno polimérico también puede comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número de al menos 800, o al menos 1000, o al menos 5000 o al menos 10 000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 80 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 800 hasta aproximadamente 5000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 1000 hasta aproximadamente 10 000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 5000 hasta aproximadamente 20 000.

45 La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 10 000 hasta aproximadamente 20 000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender también al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 20 000 hasta aproximadamente 30 000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender de forma alternativa al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 30 000 hasta aproximadamente 50 000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede

comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 50 000 hasta aproximadamente 80 000.

5 La composición puede comprender menos de aproximadamente un 10 % (p/p), y más preferentemente, menos de aproximadamente un 5 % (p/p), de compuestos terpénicos que son solubles en un disolvente orgánico polar e insolubles en un disolvente orgánico no polar. En modos de realización particulares, la fracción está sustancialmente desprovista de compuestos terpénicos que son solubles en un disolvente orgánico polar e insolubles en un disolvente orgánico no polar. Por tanto, la composición puede comprender menos de aproximadamente un 10 % (p/p), y más preferentemente, menos de aproximadamente un 5 % (p/p) de compuestos terpénicos monoméricos, o está sustancialmente desprovista de monómeros de mirceno.

10 Como se menciona en el presente documento, los compuestos terpénicos incluyen formas monoméricas y oligoméricas de compuestos terpénicos, incluyendo aquellos clasificados diversamente como monoterpénos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos y tetraterpenos, incluyendo sus formas ácidas, aldehídicas y alcohólicas. La composición puede comprender menos de aproximadamente un 10 % (p/p), y más preferentemente, menos de aproximadamente un 5 % (p/p), de un compuesto terpénico seleccionado del grupo que consiste en: β -mirceno, α -mirceno, *cis*- α -ocimeno, dihidromirceno, limoneno, α -pineno, β -pineno y combinaciones de los mismos.

15 En un modo de realización particular, la fracción aislada de mirceno polímero se deriva de una planta y la composición está sustancialmente desprovista de monómeros de mirceno y formas oligoméricas de mirceno que tienen un grado de polimerización menor de aproximadamente 6. De forma alternativa, la fracción aislada de mirceno polimérico se puede derivar de una planta y la composición está sustancialmente desprovista de compuestos terpénicos que son solubles en al menos un disolvente orgánico polar e insolubles en al menos un disolvente orgánico no polar.

20 La fracción aislada de mirceno polimérico puede ser el producto de una síntesis química y la composición puede estar sustancialmente desprovista de monómeros de mirceno y formas oligoméricas de mirceno que tengan un grado de polimerización menor de aproximadamente 6. La fracción aislada de mirceno polimérico también puede ser el producto de una síntesis química y la composición puede estar sustancialmente desprovista de compuestos terpénicos que son solubles en un disolvente orgánico polar e insolubles en un disolvente no polar.

25 De acuerdo con otro aspecto, en la composición farmacéutica, el mirceno polimérico es un producto de una síntesis química o se deriva de una fuente vegetal, y el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de al menos 800 hasta 50 000, y en el que el mirceno polimérico tiene un grado de pureza de al menos un 80 %.

30 En un modo de realización particular, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en al menos un aceite y al menos una cera o combinaciones de los mismos. En un modo de realización particular, el aceite se selecciona del grupo que consiste en aceite de almendra, aceite de canola, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de uva, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de azafrán, aceite de sésamo, aceite de soja y combinaciones de los mismos.

35 En diversos modos de realización, una composición de acuerdo con la invención está en una forma adecuada para su administración por una ruta seleccionada del grupo que consiste en oral, tópica, parenteral y transdérmica.

40 En modos de realización particulares, la composición está en una forma adecuada para administración por inyección. En diversos modos de realización, la composición es una formulación parenteral para su administración por una ruta seleccionada del grupo que consiste en intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, intracerebral, intracerebroventricular, intraósea e intratecal. En diversos modos de realización, la composición es una formulación tópica para su administración por una ruta seleccionada del grupo que consiste en dérmica, vaginal, rectal, inhalatoria, intranasal, ocular, auricular y bucal.

45 En modos de realización particulares, la composición está en una forma adecuada para administración cosmética o dermatológica.

50 En modos de realización particulares, la composición farmacéutica está 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.

55 En modos de realización particulares, la formulación comprende 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. En un modo de realización particular, el complejo de inclusión comprende al menos una ciclodextrina. En un modo de realización particular, la al menos una ciclodextrina comprende hidroxipropil- β -ciclodextrina. En un modo de realización particular, la nanoemulsión comprende gotículas que tienen un tamaño de partícula promedio de menos de 800 nm. Por ejemplo, las gotículas pueden tener un tamaño de partícula promedio de 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. En un modo de realización particular, la microemulsión comprende un tensioactivo no iónico. En un modo de realización particular, el tensioactivo no iónico se selecciona 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.

La composición se puede disponer en un artículo de fabricación en forma de un recubrimiento. En un particular, 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 comprender además 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. En un modo de realización particular, el implante se selecciona 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 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.

La composición se puede usar para tratar el deterioro de la función neurológica. El deterioro de la función neurológica puede comprender una disminución en una función seleccionada del grupo que consiste en función cognitiva, función sensitiva, función motora y combinaciones de las mismas. El deterioro de la función neurológica puede estar asociado con una afección o enfermedad, incluyendo, por ejemplo, el deterioro de la función neurológica está asociado con una afección o enfermedad, incluyendo, por ejemplo, traumatismo, demencia vascular, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, apoplejía, esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, obesidad, anorexia, caquexia, infección y un trastorno inmunitario. El deterioro de la función neurológica se puede deber a la exposición a un fármaco, tal como un anestésico.

En un modo de realización particular, la composición es para su uso en el tratamiento de un trastorno de la piel o del cuero cabelludo seleccionado del grupo que consiste en alopecia, eccema, psoriasis, queratosis seborreica y seborrea. Los trastornos de la piel y el cuero cabelludo incluyen trastornos de la piel, cuero cabelludo y anejos pilosos, incluyendo, por ejemplo, las uñas y los folículos pilosos. En un modo de realización particular, el trastorno de la piel es una herida de 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, una herida por punción, una herida de metralla, una dermoabrasión, una contusión, una infección, una herida y una herida quirúrgica.

En un modo de realización particular, la composición es para su uso en el tratamiento del daño tisular. Como se usa en el presente documento, la reparación de tejidos engloba la inducción y promoción de la regeneración tisular, incluyendo de tejidos neurales.

Por tanto, la composición se puede usar 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.

Otros aspectos y modos de realización de la presente invención se divulgan en las reivindicaciones adjuntas.

Se debe entender explícitamente que el alcance de la presente invención engloba formas más cortas y largas de mirceno polimérico, incluyendo formas sintéticas y semisintéticas, incluyendo copolímeros de mirceno y derivados sustituidos con diversas funcionalidades, y conjugados con moléculas adicionales, como son conocidos en la técnica, con la estipulación de que estas variantes y modificaciones conservan la capacidad terapéutica del mirceno polimérico en el contexto de los procedimientos de la presente invención.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** muestra la cromatografía de exclusión por tamaño de un extracto de resina de mástique usando detectores SEDEX y PDA.

- La **figura 2** muestra las fracciones de peso molecular bajo (Fig. 2A) y pesado (Fig. 2B) de un extracto de resina de mástique obtenidas por cromatografía de exclusión por tamaño preparativa.
- La **figura 3** muestra el espectro de ^1H -RMN de la fracción de MW pesado obtenida por SEC preparativa de un extracto de resina de mástique.
- 5 La **figura 4** muestra el espectro de ^{13}C -RMN de la fracción de MW pesado obtenida por cromatografía de exclusión por tamaño preparativa de un extracto de resina de mástique.
- La **figura 5** muestra la cromatografía de exclusión por tamaño analítica de productos altos (Fig. 5A) y bajos (Fig. 5B) obtenidos en un procedimiento químico sintético para el mirceno polimérico.
- La **figura 6** muestra el espectro de ^1H -RMN del 1,4-poli- β -mirceno sintetizado.
- 10 La **figura 7** muestra el espectro de ^{13}C -RMN del 1,4-poli- β -mirceno sintetizado.
- La **figura 8** muestra los efectos de RPh-1 en células ARPE-19. Fig. 8A, cultivos de control tratados con vehículo oleoso; Fig. 8B, cultivos experimentales 48 horas después de la administración e incubación de RPh-1 (0,1 %; 1 mg/ml); Fig. 8C, cultivos experimentales 4872 horas después de la administración e incubación de RPh-1 (0,25 %; 2,5 mg/ml); Fig. 8D, cultivos experimentales 72 horas después de la administración e incubación de RPh-1 (0,25 %; 2,5 mg/ml).
- 15 La **figura 9** muestra el análisis por inmunofluorescencia de células ARPE-19 diferenciadas antes (paneles de la izquierda) y después (derecha) de 72 horas de incubación con RPh-1, indicando la expresión de beta 3 tubulina (TUBB3), proteína asociada al citoesqueleto regulada por la actividad (Arc/Arg3,1) y pentraxina neuronal II (NPTX2) después del tratamiento.
- 20 La **figura 10** muestra el efecto de RPh-1 en la proliferación de células ARPE-19 según el seguimiento mediante un ensayo para evaluar el contenido total de proteínas.
- La **figura 11** muestra células ARPE-19 de varios grados de diferenciación. Fig. 11A, grado 3 de diferenciación; Fig. 11B, grado 4 de diferenciación; Fig. 11C, grado 5 de diferenciación.
- 25 La **figura 12** muestra el efecto de RPh-1 en células de melanoma humano. Fig. 12A, células de control tratadas con vehículo oleoso; Fig. 12B, células tratadas con RPh-1 (5 μl) después de 48 horas de incubación, Fig. 12C, células tratadas con RPh-1 (2 μl) después de 48 horas de incubación; Fig. 12D, células tratadas con RPh-1 (5 μl) después de 72 horas de incubación.
- La **figura 13** muestra los efectos del mirceno polimérico sintetizado químicamente en células RPh-1. Fig. 13A, diferenciación inducida con la fracción 18.1; Fig. 13B, diferenciación inducida con la fracción 18.2.
- 30 La **figura 14** muestra la regeneración de la piel en un perro macho Golden Retriever envejecido que sufre una lesión dérmica asociada con alopecia después del tratamiento con RPh-1. Fig. 14A, antes del tratamiento; Fig. 14B, después de 2 semanas de tratamiento.
- La **figura 15** muestra el efecto de RPh-1 en la cicatrización de heridas de heridas infligidas en ratones experimentales según lo indicado por el tamaño de la herida (mm^2) en varios puntos de tiempo después de la herida en ratones tratados con RPh-1 mediante inyección SC (Grupo A, gris barras), tópicamente (Grupo B, barras negras) y en ratones tratados con vehículo solo (Grupo C, barras abiertas).
- 35 -**figura 16** muestra el efecto de RPh-1 en la recuperación de la hipoperfusión cerebral en un modelo de rata con demencia vascular, como se evaluó en la prueba del laberinto de agua de Morris.
- 40 Los resultados de los animales tratados con RPh-1 (Grupo A; barras sombreadas transversales), los animales tratados con vehículo (Grupo B; barras con rayas horizontales) y los animales de control con simulación (barras rellenas) se evaluaron para determinar la frecuencia en la localización de la plataforma (Fig. 16A); el tiempo pasado en el área de la plataforma (Fig. 16B); la latencia para encontrar la plataforma (Fig. 16C); la frecuencia en la localización de la zona 1 (Fig. 16D); el tiempo pasado en la parte iluminada (Fig. 16E); la latencia para encontrar la plataforma (Fig. 16F); y la velocidad (Fig. 16G).
- 45 La **figura 17** muestra el efecto de RPh-1 en el aumento de peso.
- La **figura 17A** muestra el aumento de peso en animales después de la hipoperfusión cerebral en un modelo de rata con demencia vascular. El peso de los animales del Grupo B (tratados con RPh-1; símbolos de triángulos) se está recuperando significativamente más rápido que el de los animales del Grupo A (tratados con vehículo; símbolos de cuadrados).
- 50 La **figura 17B** muestra el aumento de peso de los ratones obesos (ob/ob) después del tratamiento con RPh-1, ya sea por administración subcutánea (Grupo A; símbolos de rombos) o por administración tópica (Grupo B; símbolos

de cuadrados), o tratamiento con vehículo solo (Grupo C; símbolos de triángulos). Los ratones del grupo B y C ganaron un 10,2 % y un 9,1 %, respectivamente. La tasa de aumento de peso corporal en todos los grupos expresada por las pendientes fue similar ($p = 0,07$ (A frente a B), $0,08$ (A frente a C) y $0,43$ (B frente a C).

5 La **figura 18** muestra el efecto de RPh-1 en la recuperación de una oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO) en un modelo de apoplejía de rata.

La Fig. 18A muestra la puntuación neuromuscular (Neuroscore) en diversos puntos temporales en los días (d) como se indica, después de la MCAO en ratas tratadas con RPh-1 (Grupo A) o con vehículo (Grupo B). Se observaron diferencias significativas solo en el Grupo A, entre el día 8 y el día 14, y entre el día 8 y el día 28.

10 La Fig. 18B muestra los resultados de la prueba de la escalera en diversos puntos temporales después de la MCAO en ratas tratadas con RPh-1 (Grupo A; barras negras) o con tratamiento con vehículo (Grupo B; barras abiertas). Se descubrieron diferencias significativas entre los dos grupos solo el día 28.

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

15 La **figura 19** muestra el número promedio de células ganglionares retinianas (RGC) supervivientes después de axotomía del nervio óptico en ratas tratadas con RPh-1 y tratadas con control.

La **figura 20** muestra el análisis por inmunoelectrotransferencia de la expresión de SEMA3 (Fig. 20A) y caspasa-3 (Fig. 20B) en retinas desprendidas (RD) y retinas no dañadas (control) de animales tratados con RPh-1 o vehículo después de un desprendimiento de retina.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El autor de la presente invención ha descubierto sorprendentemente que fracciones aisladas de almáciga tienen actividad para mejorar el deterioro de la función neurológica, trastornos de cicatrización de la piel y el cuero cabelludo, y para promover la reparación de tejidos. Dichas fracciones son conocidas por contener mirceno polimérico. Además, también se ha descubierto sorprendentemente que las fracciones purificadas de mirceno polimérico presentan las mismas actividades biológicas que las observadas con fracciones aisladas de almáciga. Las actividades biológicas mencionadas anteriormente del mirceno polimérico se han demostrado tanto con el derivado de una fuente vegetal como con el sintetizado químicamente. Además, el intervalo de peso molecular del polímero y el grado de pureza de la preparación son factores importantes que influyen en la actividad biológica del mirceno polimérico. Estos resultados son altamente inesperados en vista de la técnica anterior que enseña que la fracción polimérica obtenida del mástique no tiene ningún beneficio terapéutico y, de hecho, impide determinadas actividades biológicas atribuidas a las preparaciones de mástique bruto y los extractos de mástique.

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

35 De forma ventajosa, se divulgan composiciones para su uso en el tratamiento del deterioro de la función neurológica y afecciones de la piel y el cuero cabelludo. 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.

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*.

50 Como se usa en el presente documento, el término "polímero" se refiere a un compuesto o una mezcla de compuestos, que comprende subunidades repetidas (también denominadas monómeros) de la misma estructura química, en el que los monómeros están en unión covalente. Un ejemplo de un monómero a partir del cual se puede formar un polímero es un terpeno, por ejemplo, un monoterpeno tal como el mirceno. Los polímeros pueden tener diversos grados de polimerización y, por tanto, englobar formas poliméricas de diversas longitudes de cadena. Los polímeros incluyen homopolímeros y heteropolímeros (también conocidos como copolímeros), y pueden tener diversas configuraciones isoméricas y diastereoisoméricas.

55

5 Como se usa en el presente documento, los términos "mirceno polimérico" y "polimirceno" se refieren de manera intercambiable a un polímero formado a partir de monómeros de mirceno. El mirceno polimérico engloba formas poliméricas que tienen diversos grados de polimerización y preferentemente polímeros de mirceno que tienen un grado de polimerización de al menos 6. El mirceno polimérico engloba, por tanto, el β -mirceno polimérico (poli- β -mirceno), el α -mirceno polimérico (poli- α -mirceno), homopolímeros de los mismos, heteropolímeros (también conocidos como copolímeros) que comprenden monómeros de mirceno en unión covalente directa o indirecta con monómeros heterólogos, isómeros *trans* y *cis* de los mismos, enantiómeros D y L de los mismos, o combinaciones de los mismos. El mirceno polimérico se puede obtener en forma aislada de una fuente vegetal, en particular del mástique, o puede ser el producto de una reacción de síntesis química.

10 Como se usa en el presente documento, el término "una fracción aislada de almáciga" se refiere a una fracción obtenida después de la extracción de almáciga en al menos un disolvente orgánico polar o no polar, o combinaciones de los mismos. La fracción aislada de la invención es, en general, soluble en cualquiera o los dos de disolventes orgánicos polares y no polares.

15 Como se usa en el presente documento, el término "una fracción aislada de mirceno polimérico" se refiere a una preparación de mirceno polimérico que tiene un peso molecular o un intervalo de peso molecular definido, que se separa de otros componentes químicos presentes en la fuente de la que se aisló el mirceno polimérico, en particular una mezcla de reacción química o un extracto vegetal.

20 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.

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

30 Como se usa en el presente documento, "heteropolímero" y "copolímero" se refieren a un polímero producido a partir de más de un tipo de monómero. Por tanto, por ejemplo, un copolímero de mirceno se produce a partir de monómeros de mirceno, además de un tipo heterólogo de monómero que no es mirceno. Los copolímeros incluyen copolímeros alternos, copolímeros periódicos, copolímeros aleatorios, copolímeros de bloque y copolímeros estadísticos, como se conocen en la técnica.

35 Como se usa en el presente documento, "grado de polimerización" se refiere al número de monómeros o unidades monoméricas que se asocian de forma covalente para formar un polímero, por ejemplo, el número de monómeros de mirceno en un compuesto de mirceno polimérico.

Como se usa en el presente documento, "peso molecular promedio en peso" se refiere al peso molecular promedio de un polímero que tiene moléculas de diferentes longitudes de cadena, como se expresa mediante la ecuación:

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

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

Como se usa en el presente documento, "peso molecular promedio en número" se refiere al peso molecular promedio de un polímero que tiene moléculas de diferentes longitudes de cadena, como se expresa mediante la ecuación:

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

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

50 Los términos "índice de polidispersidad" y "distribución molecular" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a la proporción del peso molecular promedio en peso con respecto al peso molecular promedio en número.

5 Como se usa en el presente documento, "compuestos terpénicos" se refiere a hidrocarburos que contienen isopreno y compuestos relacionados que contienen oxígeno, tales como alcoholes, aldehídos o cetonas (terpenoides). La unidad de isopreno ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$) es el componente básico de dichos compuestos. Los hidrocarburos terpénicos en general tienen la fórmula molecular $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$, e incluyen monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos (C40), que, respectivamente, tienen 2, 3, 4, 6 y 8 unidades de isopreno. Los terpenos se pueden clasificar además como acíclicos o cíclicos.

10 Los ejemplos de monoterpenos incluyen mirceno, limoneno y pineno, que son, respectivamente, ejemplos de monoterpenos acíclicos, monocíclicos y bicíclicos. Ejemplos de sesquiterpenos incluyen nerolidol y farnesol. Ejemplos de diterpenos incluyen cafestol y fitol. Ejemplos de triterpeno y tetraterpeno son escualeno y caroteno, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente desprovisto" significa que una preparación o composición farmacéutica contiene, en general, menos de un 3 % de la sustancia declarada, preferentemente menos de un 1 % y lo más preferentemente menos de un 0,5 %.

15 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.

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.

20 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 el mirceno polimérico.

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 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.

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.

30 Los valores numéricos indicados en el presente documento se deben entender como el valor declarado +/- un 10 %.

Fracciones aisladas de almáciga y mirceno polimérico

35 La presente invención emplea fracciones aisladas que comprenden mirceno polimérico. La fracción puede ser de una fuente vegetal, en particular almáciga, o puede ser el producto de una síntesis química. El mirceno polimérico para su uso en la invención es un compuesto polimérico, o una mezcla de polímeros de diferentes pesos moleculares, que se forman a partir de subunidades de mirceno. Las fuentes vegetales adecuadas de mirceno polimérico incluyen aquellas clasificadas en la familia *Anacardiaceae* o en una familia de plantas diferente. Las especies de plantas útiles para obtener las composiciones de la invención incluyen las de los géneros *Pistacia*, *Pinus*, *Picea*, *Juniperus*, *Alsies*, *Larix*, *Ocimum*, *Laurus* y *Lavendula*. Las especies útiles de *Pistacia* incluyen *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *P. palestina*, *P. saportae*, *P. terebinthus*, *P. vera* y *P. integerrima*. El mirceno polimérico se puede obtener de cualquier parte de la planta, incluyendo, por ejemplo, resina, hojas, ramas, bayas y semillas.

40 Una fracción aislada de mirceno polimérico se puede obtener más convenientemente a partir de almáciga, aunque se pueden usar otras partes de plantas y productos. En los ejemplos 1 y 2 del presente documento se ejemplifican diversos procedimientos para obtener y caracterizar una fracción aislada que comprende mirceno polimérico de almáciga. Están disponibles preparaciones comerciales de mástique, por ejemplo, de la Asociación de productores de goma de lentisco de Quios, o de G. Baldwin & Co., Reino Unido.

De forma alternativa, el mirceno polimérico se puede producir químicamente como un equivalente sintético de un polímero natural, tal como el *cis*-1,4-poli- β -mirceno, o puede ser un polímero de mirceno que no se conoce en la naturaleza, tal como el α -mirceno polimérico. La invención no se limita al procedimiento por el cual se produce el mirceno polimérico o si es natural, sintético o semisintético.

50 Se prevé que el mirceno polimérico pueda ser un producto sintético, producido por un procedimiento químico que usa como sustrato una forma monomérica del mirceno monoterpénico. El sustrato de mirceno monomérico se puede aislar de una planta, o se puede convertir química o enzimáticamente a partir de un terpeno precursor, como es conocido en la técnica. Por ejemplo, el β -mirceno monomérico aislado de una fuente vegetal se puede polimerizar posteriormente a β -mirceno polimérico mediante un procedimiento químico. Cuando el sustrato de mirceno se deriva de una fuente natural, el producto resultante se puede denominar producto semisintético. Los procedimientos

55

químicos para polimerizar β -mirceno se divulgan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N.ºs 4.564.718, 5.759.569, 7.232.872 y 7.214.750, y en Newmark *et al* (1988) J. Polymer Sci. 26, 71-77 (1988) y en Cawse *et al* (1986) Journal of Applied Polymer Science, vol. 31, 1963-1975.

5 Un procedimiento químico sintético adecuado emplea una reacción de polimerización aniónica, por ejemplo, la que comprende el uso de al menos un disolvente de alcano o cicloalcano y al menos un metal alcalino de alquilo. Por ejemplo, el metal alcalino de alquilo puede ser butil litio, y el disolvente de alcano puede ser hexano, o el disolvente de cicloalcano puede ser ciclohexano. El disolvente de alcano y el iniciador de metal alcalino de alquilo pueden estar presentes en la mezcla de reacción en una proporción de al menos 20:1. La reacción de polimerización aniónica se puede terminar con un compuesto tal como agua, un alcohol, oxígeno molecular y dióxido de carbono.

10 El procedimiento sintético para el 1,4-poli- β -mirceno descrito en el presente documento (ejemplo 3) es adecuado en particular para mantener las diversas actividades biológicas del polímero, tales como promover la diferenciación celular. Se conoce que el β -mirceno monomérico se encuentra en una variedad de plantas, incluyendo árboles de los géneros *Pinus*, *Picea*, *Juniperus*, *Alsies* y *Larix*, y flores de los géneros *Antirrhinum*, *Boswellia*, *Citrus* y *Gynura*.

15 Se puede obtener una fracción aislada de mirceno polimérico como producto purificado de una reacción de síntesis química, como se ejemplifica en el ejemplo 3 del presente documento. El mirceno polimérico sintetizado químicamente se puede aislar de un sustrato sin reaccionar y otros reactivos, analizar y fraccionar adicionalmente de acuerdo con el peso molecular usando procedimientos analíticos y de separación como son conocidos en la técnica. Dichos procedimientos incluyen aquellos que separan las moléculas en función del tamaño, la carga o la hidrofobia, incluyendo, por ejemplo, la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), la cromatografía de gas-líquido (GLC) y combinaciones de las mismas.

20 Los procedimientos analíticos para determinar la estructura química precisa del polímero obtenido incluyen la resonancia magnética nuclear (por ejemplo, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN), la viscosimetría, diversos procedimientos de espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF), procedimientos de combinación tales como cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)), técnicas de dispersión de la luz tal como, por ejemplo, dispersión de luz láser de múltiples ángulos (MALLS), análisis de carbono total, espectrofotometría UV-VIS, espectrofotometría en IR y FT-IR y otros procedimientos conocidos en la técnica. Los mismos procedimientos y enfoques se pueden usar para purificar y caracterizar el mirceno polimérico de las plantas, como se muestra en el presente documento en el ejemplo 2.

25 Una fracción de mirceno polimérico que es un producto de una síntesis química debe estar sustancialmente desprovista de monómeros de mirceno y formas oligoméricas de mirceno que tengan un grado de polimerización menor de aproximadamente 5. También es preferente que el producto aislado esté sustancialmente desprovisto de compuestos terpénicos monoméricos que son solubles en disolventes orgánicos polares.

30 Se pueden usar procedimientos similares para obtener fracciones aisladas de almáciga y fracciones aisladas de mirceno polimérico, cuando el mirceno polimérico se debe derivar de una fuente vegetal, como la almáciga. 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.

35 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".

40 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. Este rasgo característico distingue las fracciones aisladas de la invención de los extractos de almáciga de la técnica anterior, que incluyen, en general, una amplia variedad de compuestos que son solubles solo en disolventes polares. De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, dichos compuestos interfieren con las actividades biológicas beneficiosas de las fracciones aisladas divulgadas en el presente documento.

El extracto de dos 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 adecuado u otro vehículo para efectuar su disolución. Como se describe en el presente documento en los ejemplos 1 y 2, dichas fracciones aisladas contienen mirceno polimérico. Las fracciones obtenidas que contienen mirceno polimérico se pueden usar directamente, o purificar, caracterizar y/o fraccionar adicionalmente usando medios conocidos en la técnica, como se enumera anteriormente.

Las fracciones aisladas de la invención se obtienen 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,
- (e). aislar una fracción soluble en dicho disolvente orgánico no polar; y
- (f). opcionalmente retirar dicho disolvente orgánico no polar;

en el que las etapas (d) a (f) pueden preceder a las etapas (a) a (c).

El procedimiento puede comprender además fraccionar por tamaño la fracción soluble obtenida después de la etapa (c) o la etapa (f), por ejemplo mediante cromatografía de exclusión por tamaño, o cualquier otro procedimiento conocido en la técnica.

El procedimiento puede comprender además retirar el disolvente después de una o ambas de las etapas (c) o (f). 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. Las etapas (a) a (c) se llevan a cabo antes de las etapas (d) a (f) o viceversa. En un modo de realización particular, el disolvente orgánico polar comprende etanol y el disolvente orgánico no polar comprende hexano. 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.

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.

Las composiciones que comprenden las fracciones aisladas de almáciga como se describen en el presente documento deben comprender menos de aproximadamente un 20 % (p/p) de compuestos terpénicos monoméricos y oligoméricos que son solubles en el disolvente orgánico polar y son sustancialmente insolubles en el disolvente orgánico no polar, en las que los disolventes mencionados anteriormente se refieren a aquellos usados en la preparación de la fracción. Más preferentemente, las fracciones aisladas comprenden menos de aproximadamente un 5 % (p/p) de dichos compuestos terpénicos. Incluso más preferentemente, las fracciones aisladas están sustancialmente desprovistas de dichos compuestos terpénicos. Los efectos inhibidores de las fracciones que comprenden dichos compuestos de bajo peso molecular sobre la actividad biológica del mirceno polimérico se ejemplifican en el presente documento en el ejemplo 8.

Una fracción aislada que comprende mirceno polímero se puede derivar de una planta y está sustancialmente desprovista de monómeros de mirceno y formas oligoméricas de mirceno que tienen un grado de polimerización menor de 6. Una fracción aislada que comprende mirceno polimérico se puede derivar de una planta y está sustancialmente desprovista de compuestos terpénicos que son solubles en un disolvente orgánico polar pero son sustancialmente insolubles en un disolvente orgánico no polar.

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

- 5 No existe un límite superior particular en el peso molecular o el grado de polimerización del mirceno polimérico. El grado de polimerización es al menos aproximadamente 6, o al menos aproximadamente 10, o al menos aproximadamente 25, o al menos aproximadamente 35. El mirceno polimérico puede tener un grado de polimerización en el intervalo de al menos aproximadamente 6 hasta aproximadamente 1800. Los intervalos ejemplares adecuados incluyen de aproximadamente 30 hasta aproximadamente 500, o de aproximadamente de 35 hasta aproximadamente 150. El peso molecular promedio en número del mirceno polimérico es preferentemente al menos aproximadamente 800. Más preferentemente, el peso molecular promedio en número es al menos aproximadamente 1000, tal como al menos 2000 o al menos 3000, e incluso más preferentemente, el peso molecular promedio en número es al menos aproximadamente 5000. En un modo de realización particular, el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en el intervalo de 5000 a 20 000. En un modo de realización particular, el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en el intervalo de al menos 1000 hasta aproximadamente 50 000. En un modo de realización particular, el peso molecular promedio en número es de al menos 5000. Se debe entender que la composición puede comprender fracciones de diferente peso molecular de mirceno polimérico, por ejemplo en el intervalo de al menos aproximadamente 5000 hasta aproximadamente 20 000, así como en el intervalo de aproximadamente 25 000 hasta aproximadamente 40 000. El mirceno polimérico puede tener una distribución molecular de menos de 5.
- 10
- 15
- 20 En un modo de realización particular, la fracción aislada consiste esencialmente en mirceno polimérico que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de 5000 a 20 000.

El peso molecular del producto polimérico se puede expresar de varias maneras, por ejemplo, peso molecular promedio en peso o peso molecular promedio en número, como es conocido en la técnica. El peso molecular se puede determinar por cualquiera de varios medios, tal como dispersión de la luz, dispersión de luz láser de múltiples ángulos (MALLS), dispersión de neutrones de ángulo pequeño, dispersión de rayos X, velocidad de sedimentación, viscosimetría (ecuación de Mark-Houwink), espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF) y cromatografía de permeación en gel.

25

El mirceno polimérico puede existir como diferentes isómeros geométricos, resultantes de la disposición de sustituyentes alrededor del doble enlace carbono-carbono. Dichos isómeros se designan como la configuración *cis*- o *trans*- (también denominadas, respectivamente, la configuración Z o E), en la que *cis*- (o Z) representa sustituyentes en el mismo lado del doble enlace carbono-carbono, y *trans*- (o E) representa sustituyentes en lados opuestos del doble enlace carbono-carbono. Los diversos isómeros geométricos y mezclas de los mismos están incluidos dentro del alcance de la invención.

30

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

35

40

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

45

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

La fracción aislada de mirceno polimérico puede tener un grado de pureza de al menos un 90 %, tal como al menos un 93 %, o al menos un 95 %, o al menos un 97 %, o al menos un 98 % o al menos un 99 %. Como se entiende en la técnica, es deseable el mayor grado de pureza posible, entre otros para garantizar el cumplimiento de los requisitos de las agencias reguladoras sanitarias. Se debe entender, sin embargo, que la fracción de mirceno polimérico puede contener especies poliméricas de mirceno que tienen diversos pesos moleculares, tales como dentro de un intervalo estrecho o amplio definido, sin reducir el grado de pureza especificado. Además, la fracción aislada de mirceno polimérico puede contener diferentes isómeros estructurales como se describe anteriormente de mirceno polimérico sin reducir el grado de pureza especificado. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90 % (p/p) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender una mezcla de *cis*-1,4-poli- β -mirceno y *trans*-1,4-poli- β -mirceno, en la que la mezcla comprende al menos un 80% (p/p) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número de al menos 800. El peso molecular promedio en número puede ser de al menos 1000. El peso molecular promedio puede ser de al

50

55

menos 2000. El peso molecular promedio en número puede ser de al menos 3000. El peso molecular promedio en número puede ser de al menos 5000. El peso molecular promedio en número puede ser de al menos 10 000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 800 hasta aproximadamente 5000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90% (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 1000 hasta aproximadamente 10 000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 10 000 hasta aproximadamente 20 000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 5000 hasta aproximadamente 20 000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede consistir esencialmente en *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 5000 hasta aproximadamente 20 000.

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

La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 20 000 hasta aproximadamente 30 000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 30 000 hasta aproximadamente 50 000. La fracción aislada de mirceno polimérico puede comprender al menos un 90 % (w/w) de *cis*-1,4-poli- β -mirceno que tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de aproximadamente 50 000 hasta aproximadamente 80 000.

La fracción aislada de mirceno polimérico preferentemente se purifica sustancialmente de compuestos terpénicos que son solubles en un disolvente orgánico polar pero sustancialmente insolubles en un disolvente orgánico no polar. En particular, la composición debe comprender menos de aproximadamente un 10 % (p/p), y más preferentemente, menos de aproximadamente un 5 % (p/p), y lo más preferentemente, menos de aproximadamente un 3 % (p/p) de compuestos terpénicos que son solubles en un disolvente orgánico polar pero sustancialmente insolubles en un disolvente orgánico no polar. En modos de realización particulares, la composición está sustancialmente desprovista de compuestos terpénicos que son solubles en un disolvente orgánico polar pero insolubles en un disolvente orgánico no polar. La composición puede comprender menos de aproximadamente un 10 % (p/p), y más preferentemente menos de aproximadamente un 5 % (p/p), y lo más preferentemente, menos de aproximadamente un 3 % (p/p), de compuestos terpénicos monoméricos. La composición puede estar sustancialmente desprovista de monómeros de mirceno y formas oligoméricas de mirceno que tienen un grado de polimerización menor de aproximadamente 5. La composición puede comprender menos de aproximadamente un 10 % (p/p), y más preferentemente, menos de aproximadamente un 5 % (p/p), y lo más preferentemente, menos de aproximadamente un 3 % (p/p), de un compuesto terpénico seleccionado del grupo que consiste en: β -mirceno, α -mirceno, *cis*- α -ocimeno, dihidromirceno, limoneno, α -pineno, β -pineno y combinaciones de los mismos.

Composiciones farmacéuticas

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

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

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, aceite de almendra, aceite de canola, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de uva, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de azafrán, aceite de sésamo, aceite de soja o combinaciones de los mismos.

El vehículo farmacéuticamente aceptable puede, de forma alternativa o además, comprender un sustituto del aceite adecuado. 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 isosteárido, 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 diisosteárido, 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 Para preparar la composición farmacéutica, el mirceno polimérico se puede formular de forma adecuada como complejos de inclusión, nanoemulsiones, microemulsiones, polvos y liposomas. En un modo de realización particular, un complejo de inclusión comprende al menos una ciclodextrina. Las ciclodextrinas pueden comprender hidroxipropil-β-ciclodextrina. En un modo de realización particular, las nanoemulsiones comprenden gotículas que tienen un tamaño de partícula promedio de menos de 800 nm. Por ejemplo, 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. En un modo de realización particular, los liposomas comprenden vesículas multilamelares. En un modo de realización particular, una microemulsión comprende al menos un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos incluyen aceites de ricino polietoxilado, éster de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno (polisorbatos), un poloxámero, un derivado de la vitamina E, éteres alquílicos de polioxietileno, estereatos de polioxietileno, gliceridos poliglicolizados saturados o combinaciones de los mismos.

30 Diversas formulaciones de mirceno polimérico y la preparación de las mismas se divulgan en el presente documento en los ejemplos 17-21. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar por cualquier medio que logre su propósito previsto. Por ejemplo, la administración puede ser por ruta oral, parenteral, tópica o transdérmica. La administración parenteral incluye las rutas de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraarterial, intrauterina, intrauretral, intracardíaca, intracerebral, intracerebroventricular, intrarrenal, intrahepática, intratendinosa, intraósea e intratecal. La administración tópica incluye la aplicación por medio de una ruta seleccionada de 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.

40 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 del mirceno polimérico en la presente invención 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.

45 En general, la cantidad de mirceno polimérico o fracción aislada de la almáciga presente en la composición farmacéutica puede estar convenientemente en el intervalo de aproximadamente 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 mirceno polimérico o fracción 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 mirceno polimérico o fracción 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 mirceno polimérico o fracción aislada de la almáciga en la composición puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 7 %.

50 Las composiciones farmacéuticas de la invención 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. Las formulaciones pueden ser no acuosas y/o no comprenden disolventes polares que se pongan en contacto directamente con el ingrediente activo de mirceno polimérico, para evitar la pérdida de actividad biológica del ingrediente activo. Por tanto, se pueden obtener 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 agentes disgregantes tales como los almidones mencionados anteriormente y también carboximetil-almidón, polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico 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 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 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 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, 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 también suspensiones oleosas para inyección. Los 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 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 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.

5 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.

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

15 La composición farmacéutica está preferentemente desprovista sustancialmente de compuestos terpénicos monoméricos y de bajo peso molecular, incluyendo, por ejemplo, los clasificados como monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, tetraterpenos. Los ejemplos de compuestos terpénicos incluyen β -mirreno, α -mirreno, *cis*- α -ocimeno, dihidromirreno, limoneno, α -pineno, β -pineno, tirucallol, betulonal, ácido masticadienónico, ácido masticadienólico, ácido isomasticadienónico, ácido isomasticadienólico, ácido oleanólico y ácido oleanónico.

Usos terapéuticos

20 También se divulga la composición para su uso en el tratamiento del deterioro de la función neurológica, el tratamiento de trastornos de la piel y el cuero cabelludo, la inducción de la reparación del tejido y las heridas en un sujeto que lo necesita. Para este fin, se debe administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una fracción aislada de almáciga, o una fracción aislada de mirreno polimérico, como se describe en el presente documento.

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

30 En particular, 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. En diversos modos de realización, la etapa de poner en contacto las células se puede llevar a cabo *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

35 El uso 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, demencia vascular, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, apoplejía y enfermedad de Parkinson. En otros casos, el procedimiento se puede aplicar de forma ventajosa en sujetos que sufren un deterioro de la función neurológica debido a una infección (por ejemplo, vírica, bacteriana, fúngica, parasitaria) o un trastorno inmunitario. El deterioro de la función neurológica se puede deber a la exposición a un fármaco, tal como un anestésico. 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.

45 Los trastornos de la piel y el cuero cabelludo incluyen 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.

La invención puede ser eficaz en particular para la reparación de heridas sin cicatrices.

55 La invención puede ser eficaz y económica en particular para su uso en 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.

5 La composición como se divulga en el presente documento para su uso en inducir o promover la regeneración tisular es en particular ventajosa para sujetos que tienen daño tisular que, por ejemplo, puede estar asociado con, o ser el resultado de, una lesión o traumatismo. La composición se puede 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.

Los usos de la invención se ejemplifican en los ejemplos divulgados en el presente documento. El ejemplo 4 divulga que una fracción aislada de mirceno polimérico (derivado del mástique de *Pistacia*) induce la diferenciación de las células del epitelio pigmentario de la retina.

15 El ejemplo 5 divulga que el mirceno polimérico acorta el tiempo de recuperación de la anestesia en animales de laboratorio.

El ejemplo 6 divulga que la misma fracción tiene actividad para inducir la diferenciación en líneas de células tumorales de melanoma y neuroblastoma.

20 El ejemplo 7 divulga que el mirceno polimérico sintetizado químicamente de diversos intervalos de peso molecular induce la diferenciación en las células del epitelio pigmentario de la retina.

El ejemplo 8 divulga que los compuestos de pequeño peso molecular del mástique que se separan del mirceno polimérico durante la preparación de los mismos en base a que son solubles solo en un disolvente polar de acuerdo con la invención, interfieren con la actividad inductora de la diferenciación celular ejercida por el mirceno polimérico, la reducen y la obstaculizan.

25 Los ejemplos 9, 10 y 11 divulgan que la invención se puede aplicar a la cicatrización de heridas en mamíferos y sujetos no mamíferos.

El ejemplo 12 divulga que las composiciones que comprenden mirceno polimérico de acuerdo con la invención tienen efectos de mejora en un modelo animal de demencia vascular.

30 El ejemplo 13 divulga que la invención se puede usar para estimular el apetito en sujetos afectados por diversos trastornos que dan como resultado pérdida de apetito o un aumento de peso patológico que da como resultado obesidad.

El ejemplo 14 divulga que las composiciones que comprenden mirceno polimérico de acuerdo con la invención tienen efectos de mejora en un modelo animal de apoplejía.

35 El ejemplo 15 divulga que las composiciones que comprenden mirceno polimérico de acuerdo con la invención tienen efectos de mejora en un modelo animal de traumatismo/lesión del nervio óptico

40 El ejemplo 16 divulga que las composiciones que comprenden mirceno polimérico de acuerdo con la invención tienen efectos de mejora en un modelo animal de desprendimiento de retina y proporcionan datos indicativos de reparación de heridas sin cicatrices. La etapa de poner en contacto las células se puede llevar a cabo *in vitro* o *ex vivo*. En particular, se pueden tratar de acuerdo con la invención células, o un órgano o tejido derivado del mismo que está destinado a la implantación o trasplante en el sujeto. Por ejemplo, se pueden poner en contacto con la composición explantes celulares o células o tejidos cultivados y mantenidos en cultivo. Las células pueden originarse, por ejemplo, a partir de células madre de un donante autólogo u homólogo, y estar destinadas a la regeneración y/o implantación de órganos en un receptor. En otros casos, las células son de un donante heterólogo y están destinadas a la implantación o trasplante en un receptor. Las células pueden ser las de un órgano o tejido de un donante heterólogo destinadas a la implantación o trasplante en un receptor. De forma alternativa, las células pueden ser aquellas que secretan factores solubles.

50 El uso se puede llevar a cabo antes o después de la implantación de un dispositivo médico en el sujeto. Los dispositivos médicos incluyen 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 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.

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

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.

- 5 La etapa de poner en contacto puede comprender también 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.
- 10

La invención es adecuada para su aplicación en seres humanos, mamíferos no humanos, peces y aves.

Artículos de fabricación

Los usos divulgados pueden englobar un artículo de fabricación que incorpora la composición que comprende el mirceno polimérico descrito en el presente documento.

- 15 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 del mirceno polimérico para inducir la diferenciación celular.
- 20 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 del mirceno polimérico para inducir la diferenciación celular.

- 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.
- 25

Los artículos de fabricación incluyen un artículo de tela, un pañal, un apósito para heridas, un dispositivo médico, una aguja, una microaguja, un dispositivo de inyección y un dispensador de pulverización. El artículo de fabricación puede comprender una pluralidad de microagujas. Los dispositivos médicos y los implantes son como se describen anteriormente en el presente documento.

- 30 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar de manera más completa determinados modos de realización de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Preparación de fracciones aisladas de almáciga a partir de fuentes vegetales

- 35 Procedimiento 1: 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, se dejaron sedimentar las partículas insolubles más grandes 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) 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 repetidamente durante un período de 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. A la fracción aislada obtenida se le añadió inmediatamente la cantidad deseada de aceite y la mezcla se agitó hasta obtener una mezcla homogénea.
- 40

- 45 Procedimiento 2: Se combinó resina de mástique (10 g) con metanol absoluto (300 ml) y se dejó reposar la mezcla durante la noche. Se agitó la mezcla, se dejaron sedimentar las partículas insolubles más grandes durante 20 minutos y se transfirió la fracción soluble en metanol a un nuevo matraz. Se agitó el material insoluble restante con una parte nueva de metanol absoluto (200 ml) durante 10 minutos. Esta segunda fracción soluble en metanol se combinó con la primera fracción soluble en metanol. El procedimiento se repitió con otra parte de 200 ml de metanol absoluto y una tercera fracción soluble en metanol se combinó con las dos primeras fracciones solubles en metanol. Posteriormente, se retiró el metanol 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 repetidamente durante un período de 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
- 50

previamente pesado y se retiró el hexano usando un evaporador rotatorio. A la fracción aislada obtenida se le añadió inmediatamente la cantidad deseada de aceite y la mezcla se agitó en el matraz cerrado hasta obtener una mezcla homogénea.

5 Procedimiento 3: Se pulverizó resina de mástique (5 g) se con mortero y se combinó con hexano (200 ml). Se agitó la mezcla cada 30 minutos durante un período de ocho horas y posteriormente se dejó reposar durante la noche. La fracción soluble en hexano se retiró del material insoluble y se transfirió a un matraz limpio. El hexano se retiró de la fracción soluble en hexano usando un evaporador rotatorio. A continuación, el residuo restante se sometió a un sistema de alto vacío (<0,01 mbar) durante al menos 24 horas para retirar materiales volátiles adicionales. A continuación, se le añadió etanol absoluto (100 ml) al residuo restante y se agitó la mezcla repetidamente durante un período de 1 hora. La fracción soluble en etanol se transfirió a un matraz limpio y la extracción se repitió con dos partes adicionales de 100 ml de etanol absoluto. Las fracciones solubles en etanol se combinaron y cualquier material insoluble restante se dejó sedimentar durante la noche. La solución de etanol límpida se transfirió a un matraz prepesado limpio y el etanol se retiró a vacío. Al resto se le añadió inmediatamente la cantidad deseada de aceite y se agitó la mezcla hasta obtener una formulación homogénea.

15 Procedimiento 4: Se recogieron, limpiaron y pulverizaron hojas, ramitas suaves, frutos y bayas de *Pistacia lentiscus* L., *P. atlantica* o *P. palestina*. Inicialmente, la disolución con etanol o metanol se llevó a cabo esencialmente como se describe en los procedimientos 1 y 2, y las disoluciones subsiguientes se llevaron a cabo usando combinaciones de etanol o metanol con un aceite vegetal durante varios ciclos.

20 Procedimiento 5: Se recogieron hojas (30 g) de *Pistacia lentiscus* L., se limpiaron y se cortaron en trozos pequeños con un cuchillo y se colocaron en un procesador de alimentos. Se le añadió aceite de oliva (100 ml) y se procesó. Se retiró la mezcla completa y se colocó en un vaso de precipitados vidrio. Se le añadió 200 ml de etanol (96 %) y la mezcla se calentó a 65 °C durante 20 min. Se colocó la mezcla entera en una gasa y se extrajo el líquido. La fase superior de etanol se retiró mediante pipeteo y se desechó. El etanol residual se puede retirar de la fase oleosa por evaporación.

25 Procedimiento 6: Se lavaron bayas (25 gramos) de *Laurus nobilis* (recogidas en mayo o junio) con etanol (96 %, 200 ml) durante 30 segundos. Se retiraron el etanol y las bayas y se le añadió aceite de oliva al residuo restante. Se dejó precipitar cualquier material insoluble y se aisló la solución de aceite límpida.

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

35 Procedimiento 8: Para cada preparación, se usó aproximadamente diez gramos de (i) exudado de resina recogidos de la corteza de *Pistacia lentiscus* L. o *P. palestina* que crecen en la región del monte Carmelo, Israel, o (ii) mástique de Quíos obtenido comercialmente (disponible, por ejemplo, de la Asociación de productores de goma de lentisco de Quío o de G. Baldwin & Co.). Se pulverizó la resina en un mortero, se transfirió a un vaso de precipitados de vidrio y se le añadió 100 ml de etanol (98 %). Después de agitar durante unos minutos, se decantó el etanol, dejando una masa reducida de resina debido a la retirada del material solubilizado. Se le añadió una cantidad adicional de etanol, y las etapas de agitación, decantación y adición de solvente se repitieron rápidamente durante varios ciclos, durando cada ciclo entre 5 a 30 minutos. El material insoluble que quedaba después del ciclo final (típicamente correspondiente a un 20 a un 35 % en peso del material de partida comercial, o un 10 a un 25 % del material de partida de resina recogido) se solubilizó en uno de aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de semilla de uva, aceite de sésamo, aceite de algodón o aceite de soja para obtener una concentración final de un 8 a un 10 % (p/p).

40 Procedimiento 9: Se combinó mástique pulverizado (~10 g) con 100 ml de metanol. Después de agitar durante unos minutos, se decantó el metanol, dejando una masa reducida de material blanco no soluble debido a la retirada del material solubilizado. Se le añadió una cantidad adicional de metanol, y se repitieron rápidamente las etapas de agitación, decantación y adición de disolvente durante varios ciclos. El material insoluble que quedaba después del ciclo final (típicamente correspondiente a un 20 a un 30 % en peso del material de partida) se solubilizó en aceite de oliva. El proceso de disolución implica típicamente aceite de oliva calentado a 45 °C y agitación suave en el vaso de precipitados.

Procedimiento 10: Se combinó mástique pulverizado (~10 g) con 25 ml de aceite de soja y 100 ml de metanol en un vaso de precipitados de vidrio. La agitación usando un agitador magnético se llevó a cabo durante 2 horas. El disolvente se retiró por decantación y se le añadió metanol fresco, seguido de agitación durante una hora. El disolvente se retiró por decantación, seguido de evaporación al vacío para retirar el disolvente residual.

- 5 Procedimiento 11: Se combinó mástique pulverizado (~10 g) con 100 ml de etanol (96 %) en un vaso de precipitados de vidrio. La agitación usando un agitador magnético se llevó a cabo durante 10 minutos. El disolvente se retiró por decantación y se le añadió una cantidad adicional de etanol, seguido de agitación durante 5 minutos y se decantó el disolvente. Las etapas de adición de disolvente, agitación y decantación se repitieron durante 4 ciclos. A continuación, se le añadió n-hexano (100 ml) al material blanco insoluble, seguido de agitación repetida hasta que se disolvió el material. Se desecó una pequeña muestra y se pesó para determinar la concentración. El grueso de la solución de hexano se aplicó a una columna de exclusión por tamaño calibrada y se descartó la fracción que tenía un peso molecular de hasta 1500. La fracción que tenía un peso molecular mayor de 1500 se mezcló con 20 gramos de unguento de parafina espeso. La mezcla se homogeniza mediante mezcla repetida y se retira el hexano por evaporación al vacío.
- 10
- 15 Este procedimiento también se puede realizar mezclando vaselinas y ceras que tienen un peso molecular creciente para obtener un producto más sólido.

El término "RPh-1" se usa en el presente documento para referirse a una fracción aislada preparada como en cualquiera de los procedimientos anteriores, y después de la disolución en un aceite, cera o una combinación adecuada de los mismos.

- 20 RPh-1 se usó directamente para experimentos de cultivo celular *in vitro* o para el tratamiento de animales de experimentación, típicamente en concentraciones finales que varían de un 0,025 a un 5 % en un aceite particular o mezcla de aceites, como se especifica en el presente documento. Además, como se muestra en el ejemplo 2, se determinó que el componente principal de RPh-1 es 1,4-poli- β -mirceno de peso molecular en el intervalo de 5000 a 20 000.
- 25 Ejemplo 2. Caracterización química de mirceno polimérico aislado de fuentes vegetales. Visión general

Se extrajo resina de mástique de *Pistacia lentiscus* L. de acuerdo con el procedimiento 1 o 2 para obtener la fracción deseada (denominada RPh-1) que se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para definir la distribución de pesos moleculares. La estructura química de RPh-1 se analizó mediante resonancia magnética nuclear (RMN) después del fraccionamiento por SEC preparativa.

- 30 Se descubrió que la RPh-1 contiene una fracción "ligera" con pesos moleculares por debajo de 1000 y una fracción de polímero "pesada" con peso molecular en el intervalo de 5000 a 20 000. Basado en el análisis por RMN (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) el compuesto predominante en la fracción "pesada" tiene una estructura consecuente con el de 1,4-poli- β -mirceno.
- 35 Se llevaron a cabo separaciones preparativas usando acetato de etilo y tetrahidrofurano (THF) como eluyentes. En ambos casos, se observó que la fracción polimérica "pesada" presentaba diversas actividades biológicas beneficiosas, incluyendo la de inducción de la diferenciación celular, como se describe en los ejemplos 4 y 6. Por el contrario, la fracción "ligera" demostró toxicidad en experimentos de eficacia *in vitro* que usaban células epiteliales retinianas pigmentadas. Se descubrió que, para preservar la actividad de la fracción polimérica, es muy importante protegerla de las reacciones de oxidación o de reticulación diluyéndola en un disolvente hidrófobo, preferentemente aceite, opcionalmente en combinación con una cera.
- 40

Procedimientos

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, se dejaron sedimentar las partículas insolubles más grandes 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) 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 con un evaporador rotatorio (temperatura del baño de agua 30 °C). Al resto se le añadió hexano (300 ml) y la mezcla se agitó repetidamente durante un período de dos horas. Después de dejar reposar toda la noche en el matraz cerrado para completar la precipitación de cualquier material insoluble, la solución de hexano límpida se transfirió a un matraz limpio y se usó para separaciones analíticas y preparativas.

45

50

Las macromoléculas se separan usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en base a su exclusión de la fase estacionaria. En la SEC, los compuestos de peso molecular más alto están totalmente excluidos de los poros del empaquetamiento y, por lo tanto, se eluyen primero. Los pesos moleculares de los compuestos problema de polímeros se pueden estimar por SEC en base a una comparación con una curva de calibración construida con compuestos de peso molecular conocido, por ejemplo, patrones de poliestireno. Sin embargo, los pesos moleculares del polímero determinados en base a dichas comparaciones pueden estar sujetos a un margen de error inherente de

55

al menos aproximadamente un 10 a un 15 %, ya que la relación entre el volumen hidrodinámico y el peso molecular no es la misma para todos los polímeros, por lo que solo se puede hacer una determinación aproximada.

5 Para la SEC analítica, se usó una columna de PLgel (7,5*300 mm 5 μ 10³ A°) y se calibró con patrones de poliestireno de pesos moleculares 1000, 2000, 5000, 10 000, 30 000 y 70 000. Los disolventes utilizados (hexano, acetato de etilo, tetrahidrofurano (THF), diclorometano (DCM) y acetona) eran todos de calidad analítica para la cromatografía de líquidos. Para fines analíticos, se descubrió que el THF era óptimo. El instrumento de cromatografía utilizado fue un TSP ThermoPhinnigan equipado con un detector de red de diodos o un detector ELSD, que usaba un caudal de 1 ml/min, tiempo de desarrollo de 15 minutos y THF al 100 % para la fase móvil.

La SEC preparativa se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones:

10 1. Condiciones para THF:

Columna: PLgel: 25*300 mm 5 μ 10³ A°

Fase móvil: hexano al 60 %/THF al 40 % caudal 11 ml/min.

La separación se repitió 12 veces con 1 ml de extracto cada una y se recogieron dos fracciones: 1) contenido de MW pesado; 2) contenido de MW bajo.

15 2. Condiciones para DCM:

Columna: PLgel: 25*300 mm 5 μ 10³ A°.

Fase móvil: hexano al 70 %/DCM al 30 % caudal 11 ml/min.

La separación se repitió 12 veces con 1 ml de extracto cada una y se recogieron dos fracciones: 1) contenido de MW pesado; 2) contenido de MW bajo.

20 Para cada análisis por SEC preparatoria, la columna se calibró con patrones de poliestireno de pesos moleculares 1000, 2000, 5000, 10 000, 30 000 y 70 000.

25 Las fracciones recogidas de estas dos fases móviles diferentes se dividieron en dos, una mitad se evaporó a sequedad utilizando un evaporador y se le añadió 3 ml de aceite. A la segunda mitad se le añadió 3 ml de aceite y a continuación se evaporó el disolvente orgánico. Las muestras obtenidas se analizaron para determinar la actividad biológica.

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

Resultados

SEC analítica

30 La figura 1 muestra el cromatograma analítico de SEC obtenido usando un detector PDA (línea débil) y un detector ELSD-SEDEX (línea en negrita). Una fracción correspondiente al peso molecular en el intervalo de aproximadamente 60 000 hasta aproximadamente 5000 (eluyendo a 5-7 minutos) se detectó solo con el detector ELSD. Ambos detectores indicaron la presencia de una fracción de peso molecular en el intervalo <1000.

SEC preparativa

35 La figura 2 muestra las fracciones de peso molecular pesado (Fig. 2B) y bajo (Fig. 2A) obtenidas por SEC preparativa. La fracción pesada se obtuvo por desarrollo de SEC en DCM/hexano, mientras que la fracción ligera se obtuvo por desarrollo de SEC en THF/hexano. La tabla 1 resume las fracciones obtenidas usando SEC preparativa y diversos sistemas de disolventes.

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

N.º de fracción	Intervalo de peso molecular	Eluyentes/modo de evaporación
19-1	Pesado	Evaporación de THF/hexano con aceite
19-2	Ligero	
19-3	Pesado	Evaporación de THF/hexano sin aceite
19-4	Ligero	
19-5	Pesado	Evaporación de DCM/Hexano con aceite
19-6	Ligero	

N.º de fracción	Intervalo de peso molecular	Eluyentes/modo de evaporación
19-7	Pesado	Evaporación de DMC/hexano sin aceite
19-8	Ligero	

Análisis por RMN

La figura 3 muestra el espectro de ¹H-RMN obtenido para el material de MW pesado de la SEC preparativa desarrollada en hexano al 60 %/THF al 40 %. La figura 4 muestra el espectro de ¹³C-RMN obtenido para el material de MW pesado de la SEC preparativa en hexano al 50 %/THF al 50 %.

- 5 Los análisis de ¹H-RMN y ¹³C-RMN indican que el β-mirceno 1,4-polimérico es el componente principal de la fracción de MW pesado obtenida de la SEC preparativa del material polar insoluble en solventes (RPh-1) del mástique.

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

10 Se prepararon preparaciones de β-mirceno 1,4-polimérico sintético de diversos pesos moleculares, usando procedimientos basados en general en los procedimientos divulgados en Newmark *et al* (1988) J. Polym Sci.26:71-77.

Procedimientos

15 Se añadieron los siguientes reactivos a un matraz de 3 bocas de 250 ml equipado con un condensador: β-mirceno, hexano y *sec*-butil litio en ciclohexano, todos en atmósfera de nitrógeno, en las cantidades que se muestran en la tabla 2. El volumen de hexano usado en cada reacción fue en general de al menos aproximadamente 20 a 25 veces el volumen del iniciador de butil litio. Cada mezcla de reacción se calentó a 80 °C y se agitó durante aproximadamente 1 hora. A fin de estimar la concentración de polímero, se tomó una pequeña alícuota (unos pocos ml) de solución y se evaporó a sequedad.

Para algunas mezclas de reacción, se retiró el litio después de la reacción diluyendo la mezcla final con un exceso de hexano y lavando dos veces con agua. La fase orgánica se separó y se secó con sulfato de sodio.

20 Para su uso en ensayos de actividad biológica y caracterización del peso molecular, se preparó una solución al 10 % del polímero sintetizado en aceite de oliva añadiendo aceite de oliva a una concentración final del 10 % (sin hexano) y se evaporó el solvente de hexano. El peso molecular aparente se determinó usando SEC y el cálculo a partir de una curva de calibración preparada usando patrones de poliestireno de peso molecular 2000, 5000, 10 000, 30 000 y 70 000. Las condiciones usadas para la SEC fueron las siguientes:

25 Columna: PLgel: 7,5*300 mm 5 μ 103 A°

Fase móvil: PVP al 100 %

Caudal 1 ml/min

Detector: ELSD

Resultados

30 Los pesos moleculares esperados y calculados del β-mirceno polimérico producido en diferentes condiciones de reacción se presentan en la tabla 2.

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

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

35 Como se puede observar en la tabla 2, las diversas condiciones de reacción produjeron mirceno polimérico que tenía pesos moleculares calculados en el intervalo de aproximadamente 3000 hasta aproximadamente 46 000. Los productos se pueden designar como que están en el intervalo de mirceno polimérico de alto peso molecular, es decir, <20 000 hasta aproximadamente 50 000, y mirceno polimérico de bajo peso molecular, es decir, <3000 a -

11 000. En las figuras 5A y 5B, se muestran los perfiles analíticos representativos de SEC para el β -mirceno polimérico de alto y bajo peso molecular, respectivamente.

Los productos de reacción lavados con agua produjeron resultados sustancialmente idénticos en la SEC analítica.

5 La figura 6 muestra un espectro representativo de ^1H -RMN del producto de polimerización de β -mirceno. La figura 7 muestra un espectro representativo de ^{13}C -RMN del producto de polimerización de β -mirceno.

Los análisis de ^1H -NMR y ^{13}C -NMR indican que el producto de la reacción de polimerización tiene una estructura consecuente con la de 1,4-poli- β -mirceno.

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

10 Para que la iniciación tenga éxito, la energía libre de la etapa de iniciación debe ser favorable. Por lo tanto, es necesario hacer coincidir el monómero con la fuerza adecuada del iniciador de modo que la primera adición sea "cuesta abajo". Una reacción aniónica típica es la polimerización del estireno usando butillitio, $\text{C}_4\text{H}_9\text{Li}$, en un disolvente inerte tal como el n-hexano. Cuando se llevan a cabo en las condiciones apropiadas, no se producen reacciones de terminación en la polimerización aniónica. Típicamente, se le añade un compuesto tal como agua, alcohol, oxígeno molecular o dióxido de carbono para terminar la propagación, debido a la rápida reacción con los carbaniones en los extremos de la cadena.

La polimerización aniónica da lugar a distribuciones de masa molecular muy marcadas porque los procesos de transferencia están ausentes. Si el disolvente es extremadamente puro, las cadenas de polímero seguirán activas después de que se haya consumido todo el monómero.

20 El grado de polimerización se expresa como:

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

en el que M = monómero e I = iniciador.

Como se indica anteriormente, el butil litio es un iniciador apropiado para la polimerización aniónica para moléculas que contienen isopreno, como los terpenos. Por lo tanto, se ha usado en la síntesis de 1,4-polimircenos.

25 Si bien el procedimiento descrito anteriormente se divulga en general en la técnica anterior (véase, por ejemplo, Newmark *et al* (1988) J. Polym Sci.26:71-77), las modificaciones importantes divulgadas en el presente documento son el trabajo en una alta dilución de hexano y la etapa final de cambiar el disolvente por aceite, para obtener un polímero puro que retiene su actividad biológica con alta potencia.

Ejemplo 4. RPh-1 induce la diferenciación de tipo neuronal en cultivos de células epiteliales del pigmento retiniano.

30 Visión general

También se divulga la inducción de la diferenciación y la maduración celulares, que tiene aplicación directa en la regeneración de tejido funcional, en particular tejido neuronal. Nuestros hallazgos experimentales muestran que RPh-1 induce la diferenciación de las células epiteliales del pigmento retiniano, un tejido epitelial de origen neuronal, en células neuronales morfológicas que producen axones, dendritas y uniones entre las células conocidas como sinapsis. La diferenciación morfológica en las células tratadas con RPh-1 se acompaña de la expresión *de novo* del antígeno de diferenciación específico de las neuronas $\beta 3$ tubulina. La inducción de la diferenciación de las células neuronales sugiere fuertemente que la RPh-1 afecta la diferenciación de las células madre neuronales en neuronas funcionales. El dogma actual sobre la patología de la demencia y la enfermedad de Alzheimer sostiene que la deficiencia implica la imposibilidad de que las neuronas formen uniones sinápticas funcionales (véase, por ejemplo, Kimura R, Ohno M. mpairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. Neurobiol Dis. 5 de noviembre de 2008).

45 En consecuencia, los experimentos descritos en el presente documento apoyan el uso de una fracción aislada de mástique como se describe en el ejemplo 1, así como de mirceno polimérico, una molécula activa en RPh-1, como una modalidad terapéutica para provocar la neuroregeneración en enfermedades neurodegenerativas tal como la demencia y la enfermedad de Alzheimer.

El mirceno polimérico sintético también está dentro del alcance de la invención y es útil en los usos terapéuticos de la invención.

Células del epitelio pigmentario de la retina (RPE)

50 Estudios que pretendían evaluar los efectos de RPh-1 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.

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.

- 5 Las células del RPE 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 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.

10 Procedimientos

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 estreptomina 100 µg/ml. Se dejó que las células se adhiriesen a las superficies de la placa durante la noche antes del tratamiento con RPh-1.

Se preparó RPh-1 esencialmente como se describe en el ejemplo 1, procedimiento 1, para proporcionar una solución al 10 % en un vehículo compuesto de aceite de semilla de uva, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, Mygliol® 810 o Mygliol® 812. Se añadieron las preparaciones a los cultivos en volúmenes de 0,5 µl, 1 µl, 1,5 µl, 20 µl. Estos volúmenes, introducidos en un volumen de medio de muestra global de 200 µl, corresponden a concentraciones finales de RPh-1 de un 0,025 %, un 0,1 %, un 0,25 % y un 1 %, respectivamente. El vehículo de aceite sirvió como vehículo de control y se aplicó a cultivos de control en los mismos volúmenes.

Se incubaron los cultivos en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 72 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 (véase Keisari, Y. A colorimetric microtiter assay for the quantitation of cytokine activity on adherent cells in tissue culture. J. Immunol. Methods 146, 155-161, 1992). El tinte se eluyó con SDS al 20 % y se cuantificó en un lector de ELISA a 630 nm (muestras evaluadas por triplicado). Para determinar la expresión de beta3 tubulina, se colocaron las células en cubreobjetos de vidrio estériles sumergidos en microplacas de 6 pocillos a una concentración de 105 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), estreptomina (100 µg/ml) y glutamina (2 mM). Se dejó que las células se adhirieran durante la noche a los cubreobjetos y se administró a los cultivos un 7 % de RPh-1 en aceite de oliva (o aceite de oliva solo para las preparaciones de control) a un volumen de 25 µl/ml de medio y se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ durante 72 h. A continuación, las células se lavaron 2X con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Para determinar la expresión de la proteína beta-3 tubulina en las células, los cubreobjetos de vidrio se tiñeron con un anticuerpo primario monoclonal de ratón dirigido contra la beta-3 tubulina humana seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón 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 confocal.

40 Resultados

Se encontró inesperadamente que el tratamiento de las células RPE ARPE-19 con RPh-1 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-1, 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-1 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 (Fig. 8A). Después de 48 horas de incubación en cultivo, las células tratadas con RPh-1 (0,1 %; 1 mg/ml) tenían un modificación de su conformación y desarrollaron protuberancias únicas, muy largas, gruesas y con tinción densa, que recordaban a axones de células neuronales (Fig. 8B). Después de 48 horas de incubación, las células tratadas con RPh-1 (0,25 %; 2,5 mg/ml) mostraron un número mayor de protuberancias largas más delgadas que recordaban a las dendritas (Fig. 8C); después de 72 horas de incubación con RPh-1, 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 (Fig. 8D). 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 72 horas, las células tratadas con RPh-1 dejaron de proliferar rápidamente y las células permanecieron en una densidad dispersa, lo que respalda aún más la noción de diferenciación celular.

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

10 Se demostró que el tratamiento de las células ARPE-19 con RPh-1 (5 % en aceite de semilla de algodón) da como resultado la expresión de los marcadores neuronales y de sinaptogénesis $\beta 3$ tubulina (TUBB3), un marcador de diferenciación de tipo neuronal; Arc/Arg3,1, asociado a plasticidad sináptica; y pentraxina neuronal II (NPTX2), un gen temprano neuronal inmediato que funciona en la sinaptogénesis excitatoria. El análisis por inmunofluorescencia de las células ARPE-19 diferenciadas mostró que, después de 72 horas de incubación con RPh-1, las células se tiñeron positivamente para $\beta 3$ TUB, Arc/Arg3,1 y NPTX2 (Fig. 9, paneles de la derecha), mientras que se observó poca o ninguna expresión de estos marcadores antes del tratamiento (Fig. 9, paneles de la izquierda).

15 Se obtuvieron además datos sugestivos de que el tratamiento con RPh-1 de las células ARPE-19 da lugar a la interrupción de la replicación celular. Las células se trataron con RPh-1 durante 72 horas y el contenido de proteína total (relacionado con el número total de células presentes en el cultivo) se comparó con las células ARPE-19 de control sin tratar. Como se muestra en la Fig. 10, los cultivos tratados con RPh-1 contenían un contenido de proteína significativamente menor en comparación con los cultivos de control, lo que confirma que la proliferación celular se detuvo sustancialmente.

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

En base a los resultados anteriores, se desarrolló un sistema de puntuación para evaluar la potencia de RPh-1 para inducir la diferenciación en cultivo celular, con células colocadas en placas a una concentración de 2×10^3 por pocillo. Los grados y sus respectivas descripciones se exponen en la tabla 3.

Tabla 3.

Grado	Descripción del efecto de diferenciación
0	Sin efecto. Las células proliferan, los cultivos se vuelven confluentes y las células mantienen su morfología poligonal y en forma de huso típico.
1	Las células producen granulación pigmentada, pero continúan proliferando.
2	Menos de un 10 % de las células experimentan cambios morfológicos para producir protuberancias alargadas, similares a dendritas
3	Aproximadamente un 10-30 % de las células muestran protuberancias alargadas. Reducción de la proliferación celular en comparación con las células de control no tratadas
4	Más de un 30 % de las células forman protuberancias alargadas similares a dendritas que forman uniones entre células adyacentes, así como extensiones gruesas similares a axones.
5	Todo el cultivo experimenta diferenciación. Las células permanecen dispersas y todas ellas sufren cambios morfológicos que culminan en la formación de protuberancias alargadas de tipo dendrítico, estructuras similares a axones y uniones intercelulares.

25 Ejemplos representativos de cultivos celulares en los grados 3, 4 y 5 se presentan en las figuras 11A, 11B y 11C, respectivamente.

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

Cada vez es más evidente que la anestesia está asociada con daño neuronal, y se requieren procedimientos seguros y eficaces para la neuroprotección contra dicho daño.

30 Procedimientos

Se inyectó RPh-1 a ratones C57B1/6, 8 por grupo, por vía subcutánea tres veces durante 7 días (días alternos) con 0,05 ml de una solución al 3 % en aceite de semilla de uva para una dosis de 30 mg/kg.. Se sometió después a los ratones a una dosis subletal (120 mg/kg) de ketamina que se administró a los ratones. Un grupo de control se trató con 0,05 ml del vehículo de aceite de semilla de uva.

35 Resultados

Después de la anestesia, los ratones tratados con RPh-1 se recuperaron significativamente más rápido, como lo demuestra su movilidad completa, mientras que los controles aún estaban inmóviles. La recuperación en el grupo de control como se define por la capacidad de recuperar la movilidad tardó 3 minutos más en el grupo de control en

comparación con el grupo tratado con RPh-1. Esta observación indica que el ingrediente activo mirceno polimérico en RPh-1 acorta el período de recuperación y se puede usar para la neuroprotección contra los efectos secundarios adversos asociados con los fármacos anestésicos.

Ejemplo 6. RPh-1 induce la diferenciación celular seguida de muerte celular en líneas de células tumorales

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

Procedimientos

- 10 Se colocaron células en placas a 2×10^3 células por pocillo en microplacas de fondo plano de 96 pocillos (Costar) y se cultivaron en 200 ml de medio DMEM (medio de Dulbecco) complementado con 10 suero fetal bovino, L-glutamina 200 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 microgramos/ml de estreptomycin (todos los reactivos de Gibco-BRL). Después de la unión durante la noche, se le añadió RPh-1 (de una solución al 10 % en aceite de semilla de uva) a los cultivos celulares para proporcionar concentraciones finales de un 0,025 %, 0,1 %, 0,25 % y 15 0,5 %, y la incubación se continuó durante 48 y 72 horas.. El vehículo de aceite de semilla de uva se utilizó como control. Después de 72 horas, las células se fijaron con metanol y se tiñeron con reactivos Hemacolor® (Boehringer Mannheim).

Resultados

- 20 Se descubrió que el tratamiento de las células de melanoma con RPh-1 induce la formación de melanina después de 24-48 horas, como se muestra en la Fig. 12B y en la Fig. 12C, en comparación con las células tratadas con control en la Fig. 12A. El tratamiento con RPh-1 provocó además la detención de la replicación, como se muestra por la disminución de la densidad celular, por ejemplo en la Fig. 12D. A las 72 horas, se observó la muerte celular en cultivos incubados con cada una de las cuatro concentraciones de RPH-1 analizadas.

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

Conclusión

- 30 El mirceno polimérico, un componente activo en RPh-1, se asocia con la inducción de la diferenciación de diversas líneas celulares derivadas de los cánceres melanoma y neuroblastoma.

- Un bloqueo en la diferenciación terminal se reconoce como una vía importante en la perpetuación de la proliferación celular en el cáncer. Superar este bloqueo ya ha demostrado ser una modalidad de tratamiento eficaz para varias formas de cáncer (por ejemplo, los retinoides en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda) y ahora es conocido como "tratamiento dirigido". El tratamiento dirigido no destruye las células cancerosas, sino que modifica su comportamiento, principalmente al inducir la diferenciación. En consecuencia, se puede reducir la malignidad de muchos cánceres.

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

Ejemplo 7. El mirceno polimérico sintetizado químicamente induce la diferenciación celular en los cultivos de células epiteliales de pigmento retiniano.

- 45 Se llevaron a cabo experimentos para determinar si el mirceno polimérico sintético de dos intervalos de peso molecular diferentes induce la neurodiferenciación en las células ARPE-19.

Procedimientos

- 50 Se colocaron células ARPE-19 en microplacas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano (Costar) a una concentración de 5×10^3 células por pocillo ($2,5 \times 10^4$ 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 las fracciones de mirceno polimérico sintetizado químicamente.

Se analizaron fracciones aisladas de mirceno polimérico sintetizado químicamente, que tienen distintos pesos moleculares, para determinar su actividad en el ensayo de diferenciación de células de RPE. Se usaron la fracción

18-1 (peso molecular en el intervalo de aproximadamente 50 000 daltons), y la fracción 18-2 (peso molecular en el intervalo de aproximadamente 20 000 daltons), descrita en el Ejemplo 3. Las fracciones 18-1 y 18-2, y RPh-1 se prepararon cada una a una concentración del 10 % en aceite de oliva. Se le añadió cada preparación a los cultivos de células ARPE-19 usando volúmenes de 0,5 µl, 2 µl, 5 µl y 20 µl, correspondientes a concentraciones finales de 0,025 %, 0,1 %, 0,25 % y 1 %, respectivamente. El vehículo de aceite de oliva sirvió como vehículo de control y se aplicó a cultivos de control en los mismos volúmenes. Los cultivos se incubaron en una incubadora de CO₂ al 5 % a 37 °C durante 72 horas. A continuación se retiró el medio, los cultivos se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijaron con metanol absoluto durante 10 minutos y se tñieron con reactivos Hemacolor®.

10 Resultados

Se demostró que ambas fracciones 18-1 y 18-2 tienen actividad para inducir la neurodiferenciación en células ARPE-19 (Fig. 13 y Tabla 4). Se observó una actividad óptima con la fracción 18-1 al 0,25 % (como se muestra en la Fig. 13A), mientras que el 0,1 % fue algo eficaz y el 0,025 % no tuvo efecto (Tabla 4). El efecto de la fracción 18-2 se muestra en la Fig. 13B.

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

Fracción	Volumen (ul)	Resultados
18-1	0,5	Alta densidad celular. Sin diferenciación
	2	Alta densidad. Células diferenciadas
	5	Densidad más baja. Células diferenciadas. Axones largos con uniones intercelulares.
	20	Muerte celular
18-2	0,5	Baja densidad. Pocas células totalmente diferenciadas.
	2	Células diferenciadas pero axones más cortos y menos prevalentes que 18-1.
	5-20	Muerte celular
RPh-1	0,5	Células diferenciadas en grupos. Axones largos
	2	Células diferenciadas con menor densidad. Axones largos
	5-20	Muerte celular
Vehículo petrolero	0,5-20	Densidad celular muy alta, sin diferenciación.

Conclusión

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

20 Los resultados observados también apoyan la conclusión de que el mirceno polimérico, ya sea aislado de una fuente vegetal o sintetizado químicamente, tiene actividad en la inducción de la diferenciación de las células neuronales.

Ejemplo 8. El efecto de RPh-1 en la inducción de la diferenciación celular está bloqueado por la fracción soluble en disolventes polares presente en la resina de mástique.

Visión general

25 La resina de mástique y diversos compuestos identificados en ella se han asociado con una variedad de actividades biológicas y terapéuticas beneficiosas. Diversas divulgaciones de la técnica anterior indican que la actividad biológica está asociada con una fracción que se obtiene mediante la extracción de mástique con un disolvente polar, y la recuperación del material soluble en disolvente polar. Por el contrario, RPh-1 es una fracción que se ha aislado de la resina de mástique en base a que es soluble tanto en disolventes orgánicos polares como en disolventes orgánicos no polares, mientras que los compuestos que son solubles solo en disolventes orgánicos polares pero no en disolventes orgánicos polares se descartan (esto últimos denominados en el presente documento fracción SP).

30 Un componente principal en RPh-1 es el mirceno polimérico, como se muestra en el ejemplo 2. Sin embargo, este compuesto no se ha atribuido previamente con efectos beneficiosos, sino que más bien se ha reconocido que interfiere con la administración oral y la biodisponibilidad de los compuestos activos presentes en la resina de mástique. La fracción SP corresponde a las fracciones de mástique de la técnica anterior a las que se han atribuido diversas actividades biológicas beneficiosas. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de SP sobre el efecto de diferenciación celular ejercido por RPh-1. Ahora se divulga que los compuestos presentes en SP interfieren con los efectos de diferenciación celular inducidos por RPh-1 y los bloquean.

35

Procedimientos

Se trató resina de mástique para obtener RPh-1, esencialmente como se describe en el procedimiento 1 del ejemplo 1, utilizando etanol como disolvente polar. La fracción soluble en etanol se separó por decantación del material insoluble para obtener la fracción SP. Se prepararon mezclas de RPh-1 y fracción SP en diferentes proporciones de la siguiente manera:

5

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

Además, se preparó mástique entero disuelto en aceite (calentado a 60 °C) para obtener la preparación TC.

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

10

Estos resultados muestran que a las potentes actividades inductoras de neurodiferenciación solo contribuyeron los polímeros en RPh-1, mientras que la fracción polar SP solo causó la muerte celular.

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

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

Ejemplo 9. Cicatrización en perros

Un perro macho Golden Retriever de edad avanzada tuvo una herida crónica abierta en la pierna durante más de 6 meses. La lesión dérmica se asoció con alopecia (pérdida de pelaje) y despigmentación de la piel circundante. El perro fue tratado durante varios ciclos de tratamiento tópico con RPh-1. Después de la aplicación inicial, se produjo un edema transitorio con hinchazón durante 16-20 horas. Esto fue seguido por la formación *de novo* de tejido epitelial funcional (epitelización) y neoangiogénesis (nueva formación de microvasculatura) con contornos de tejido normales, resultantes de formaciones rápidas y vigorosas de tejido de granulación. La cicatrización se contrajo hacia el centro de la herida, lo que sugiere la presencia de fibromiocytes (de origen mesodérmico).

La herida cicatrizó completamente en aproximadamente 12 semanas con una piel predominantemente funcional y un nuevo crecimiento del pelaje. La figura 14 muestra el área afectada antes (Fig. 14A) y después (Fig. 14B) del tratamiento con RPh-1.

En otro perro macho de edad avanzada afectado por alopecia, el tratamiento tópico con RPh-1 dio como resultado un nuevo crecimiento del pelaje para integrarse con el pelaje circundante.

Un perro diferente tenía un tumor en la mandíbula (no inducido), partes del cual sobresalían en la cavidad bucal. Las partes sobresalientes se extirparon quirúrgicamente, mientras que las secciones del tumor que estaban incrustadas dentro de la mandíbula no se pudieron extirpar. El tumor fue diagnosticado como un sarcoma. Se aplicó RPh-1 formulado en aceite de semilla de uva al área afectada de la mandíbula. El tratamiento provocó la cicatrización completa de las encías que cubrían el sitio de la incisión quirúrgica en la medida en que no quedaba cicatriz y el sitio de la incisión quirúrgica ya no era perceptible. Incluso la recurrencia esperada del tumor a partir de partes incrustadas en la mandíbula se evitó durante un intervalo prolongado de varias semanas. El tratamiento con RPh-1 indujo una cicatrización extraordinariamente rápida del sitio de la incisión quirúrgica y la regeneración completa de las encías.

En los dos casos anteriores, la cicatrización de las heridas estuvo acompañada por un aumento general de la vitalidad, la conciencia mental y la actividad física en los perros tratados.

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

Ejemplo 10. Tratamiento de heridas en peces.

Tanto el pez dorado como el pez koi (ambos en la familia de la carpa) son propensos a las úlceras de tegumento causadas por bacterias, en particular *Aeuromonas hydrophila*.

Se dividieron peces dorados que pesaban aproximadamente 100 gramos cada uno, que habían desarrollado úlceras bacterianas, en dos grupos en tanques separados, conteniendo cada grupo cuatro peces. Cada tanque se llenó con un volumen de 100 litros de agua y se mantuvo bajo aireación con una bomba de aire. Los grupos se aleatorizaron por peso y tamaño de la herida (en el intervalo de 1-1,5 cm por 1-1,5 cm). Se inyectó intramuscularmente a cada pez a través de tegumento intacto, en un sitio de aproximadamente 5 mm de una úlcera, 20 microlitros de aceite de semilla de uva solo (grupo de control), o una solución al 1 % de RPh-1 en aceite de semilla de uva (grupo de tratamiento).

Los peces en el grupo experimental comenzaron a mejorar progresivamente después de 4 ciclos de tratamiento con RPh-1 y se curaron durante un período de un mes. Todos los peces de este grupo sobrevivieron durante las seis semanas de duración del estudio. Estos peces también mostraron un comportamiento de alerta y respuesta que incluía la natación activa, la búsqueda y el arrebato de los alimentos proporcionados en la superficie del agua y el rápido movimiento de sobresalto en respuesta a la percusión en la pared del tanque.

Por el contrario, los peces en el grupo de control no mostraron mejoría en la condición de sus úlceras. Los peces estaban letárgicos, presentaban un comportamiento sedentario en el fondo del tanque y no respondían a la estimulación. Todos los peces de este grupo murieron al cabo de seis semanas.

Las diferencias entre estos dos grupos fueron altamente significativas en ambos parámetros: supervivencia de los peces y cierre de la herida.

Ejemplo 11. Efecto de RPh-1 en la cicatrización usando el modelo de ratones B6,V-Lepob/Olahsd

Se utilizaron ratones B6,V-Lepob/OlaHsd (ob/ob) (obesidad expresa a la edad de 4 semanas) para evaluar el efecto de RPh-1 en la cicatrización. Se realizó punción cutánea de espesor total con un punzón para biopsia desechable (Uni-Punch® Disposable Biopsy Punch, Premier) en la zona distal de la espalda de cada ratón. La punción tiene forma de elipse. La longitud media de las punciones en el eje largo varió entre 5,1 y 5,3 mm. La longitud del eje de anchura promedio de los pinchazos varió entre 4,8 y 5,1 mm. Se inyectó RPh-1 (5 %) en aceite de oliva por vía subcutánea en dos sitios que rodeaban la herida a una distancia de 3-5 milímetros desde el borde de la herida (Grupo A, $n = 6$) o tópicamente sobre la herida (Grupo B, $n = 6$). El vehículo se aplicó tópicamente sobre las heridas

de ratones (Grupo C, $n = 6$). Posteriormente, se aplicó RPh1 (5 %) 3 veces a la semana, 7 veces en total, durante los 16 días del estudio a un volumen de dosis de 20 μ l (inyección) o un volumen de dosis de 50 μ l (administración tópica).

5 La Fig. 15 muestra que en el día 11 después de infligir la herida, el tamaño de la herida (área de la herida) se redujo significativamente en ratones tratados con RPh-1 (Grupo A) en comparación con los tratados con vehículo solo ($p = 0,005$) (Grupo DO). La tasa de cicatrización durante el período comprendido entre el día 0 y el día 11 después de la herida fue significativamente más rápida en los ratones tratados con RPh-1 en comparación con los tratados con vehículo solo ($p=0,034$).

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

15 La demencia vascular (VD, por sus siglas en inglés) es un subtipo de demencia con una prevalencia que es solo superada por la de la enfermedad de Alzheimer en las sociedades occidentalizadas. La VD causa muchos problemas neuropsiquiátricos y físicos, y representa una carga económica significativa. Las imágenes cerebrales han revelado cambios evidentes en la corteza cerebral y en la materia blanca, y se cree que estas lesiones son la patología central de las disminuciones cognitivas en pacientes con demencia vascular (véase, por ejemplo, Farkas *et al.*, Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain. *Acta Neuropathol.* 2004;108:57-64; Stenset *et al.*, White matter lesion subtypes and cognitive deficits in patients with memory impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2008 26:424-431).

20 Las lesiones cerebrales pueden ser inducidas experimentalmente en el cerebro de ratas por oclusión permanente de ambas arterias carótidas comunes que pueden afectar la función cognitiva. Este modelo es similar a la demencia vascular y la técnica experimental puede disminuir el flujo sanguíneo en la corteza cerebral y el hipocampo hasta en un 40-80 % durante varios meses, lo que induce ciertos trastornos de aprendizaje. Por tanto, este modelo se usó para estudiar los efectos del tratamiento con RPh-1 para revertir las deficiencias causadas por las lesiones de demencia vascular.

25 Un total de 40 animales se aleatorizaron en 3 grupos, es decir, un grupo de control de simulación no tratado, un grupo de control con vehículo y un grupo tratado con RPh-1 (10-15 animales por grupo). Fueron aleatorizados en 3 grupos, un grupo de control con simulación no tratado, un control de vehículo y un grupo tratado con RPh-1. Se administraron por vía subcutánea diez μ l de RPh-1 (5 % en aceite de semilla de algodón) o vehículo, 2 veces por semana, y la primera dosis se administró 14 días después de la inducción de la demencia vascular.

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

35 Los resultados de los animales tratados con RPh-1 (barras sombreadas transversales), los animales tratados con vehículo (barras abiertas) y los animales de control con simulación (barras negras) se evaluaron para determinar la frecuencia en la localización de la plataforma (Fig. 16A); el tiempo pasado en el área de la plataforma (Fig. 16B); la latencia para encontrar la plataforma (Fig. 16C); la frecuencia en la localización de la zona 1 (Fig. 16D); el tiempo pasado en la parte iluminada (Fig. 16E); la latencia para encontrar la plataforma (Fig. 16F); y la velocidad (Fig. 16G). Todas las pruebas mostraron un rendimiento significativamente mayor en los animales tratados con RPh-1 en comparación con al menos uno de los grupos de control.

50 Ejemplo 13. Efecto de regulación del control de peso patológico de RPh-1 (efecto orexígeno y antiobesidad).

Los perros con diversas heridas descritas en el ejemplo 9 sufrieron adicionalmente pérdida de apetito y no comieron alimentos colocados frente a ellos. Después de aproximadamente 10 días de tratamiento con RPh-1 como se describe, los perros recuperaron gradualmente el interés por la comida y comenzaron a comer. En un mes, los perros mostraron un gran interés en la comida y el apetito era similar al de los perros normales y sanos.

55 Los peces con ulceraciones descritos en el ejemplo 10 sufrieron adicionalmente pérdida de apetito. El grupo de control continuó ignorando los alimentos aplicados en el agua, mientras que los peces tratados con RPh-1 respondieron con entusiasmo con un movimiento rápido en respuesta a la administración de alimentos.

Las ratas descritas en el ejemplo 12 sufrieron adicionalmente pérdida de peso después de una hipoperfusión cerebral crónica. Después de 35 días de tratamiento (día 56 del estudio), las ratas tratadas con RPh-1 como se describe recuperaron su peso significativamente más rápido que los animales tratados con vehículo (Fig. 17A).

- 5 Los ratones descritos en el ejemplo 11 sufren en general de obesidad como resultado de la mutación del gen de la leptina. La figura 17B muestra que la administración subcutánea de RPh-1 a ratones (Grupo A; símbolos de rombos), causa un aumento de peso corporal significativamente menor en comparación con los animales tratados con vehículo (Grupo C; símbolos de triángulos) o animales tratados con la administración tópica de RPh-1 (Grupo B; símbolos de cuadrados). Los ratones del grupo A ganaron un 4,9 % durante los 11 días. La ganancia de peso corporal se comparó con el peso corporal inicial (día 0). La ganancia de peso corporal del grupo A es significativamente menor que la ganancia de peso corporal promedio de los ratones del grupo B (valor de $p = 0,02$, T-TEST, Excel). Los ratones del grupo C fueron similares ($p = 0,08$) a los ratones del grupo B y ganaron peso corporal de forma significativamente diferente (valor de $p = 0,04$) a los ratones del grupo A. Los ratones del grupo B y C ganaron un 10,2 % y un 9,1 % respectivamente. La tasa de aumento de peso corporal en todos los grupos expresada por las pendientes fue similar ($p = 0,07$ (A frente a B), 0,08 (A frente a C) y 0,43 (B frente a C).
- 10
- 15 Las observaciones anteriores apoyan la conclusión de que RPh-1 es un regulador del trastorno de peso patológico y puede servir como un agente orexígeno (estimulante del apetito) o antiobesidad.

Ejemplo 14. Efecto de la RPh-1 en el modelo de apoplejía de la oclusión de la arteria cerebral transitoria (tMCAO) en ratas.

20 En un estudio para evaluar la capacidad de RPh-1 para prevenir o revertir el déficit neurológico como resultado de la isquemia utilizando el modelo de oclusión arterial cerebral media transitoria de rata (tMCAO), se administró RPh-1 (5 % en aceite de semilla de algodón) por vía subcutánea a una dosis de 10 μ l y la primera administración se realizó 3 h después del procedimiento quirúrgico y luego dos veces a la semana hasta la finalización del estudio el día 28. Durante el estudio se evaluaron las funciones neurológicas, motoras y somatosensitivas en una batería de pruebas de comportamiento.

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

Se observaron claras diferencias entre el grupo tratado con RPh-1 y el grupo de control tratado con vehículo en la recuperación de la función neurológica después de la apoplejía durante los 28 días posteriores a la apoplejía. En general, se demostró una recuperación acelerada y mejorada en los animales que fueron tratados con RPh-1. Las funciones somatosensitivas fueron más sensibles al tratamiento, y se demostró una respuesta significativa ya el día 8 después de la apoplejía (Figs. 18A y 18C). La evaluación de Neuroscore mostró diferencias significativas que se observaron solo en ratas tratadas con RPh-1 (Grupo A), entre el día 8 y el día 14, y entre el día 8 y el día 28 (Fig. 18A). La recuperación neurológica como se evaluó por la prueba de retirada del parche fue significativa solo en ratas tratadas con RPh-1 (Grupo A) entre el día 2 y los otros días (Fig. 18C). La mejora de la función motora como se evaluó mediante la prueba de las escaleras fue significativa solo en ratas tratadas con RPh-1 (barras negras), en el día 28 (Fig. 18B).

30

35

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

40 Se realizó axotomía del nervio óptico en el ojo derecho de ratas profundamente anestesiadas (19 ratas por grupo). El grupo experimental recibió una inyección subdérmica en el área posterior del cuello de RPh-1 (5 % en aceite de semilla de algodón); 0,025 ml/inyección), y el grupo de control recibió una inyección similar con el mismo volumen de vehículo. La primera inyección se administró a todos los animales directamente después de la cirugía. Las inyecciones posteriores (la misma dosis y procedimiento de administración) se administraron dos veces por semana, cada 3 a 4 días.

45 Catorce días después de la axotomía, se insertó en el nervio óptico axotomizado un neurotrazador retrógrado fluorescente (Di-Asp) a fin de teñir las células ganglionares retinianas supervivientes (RGC), y 24 horas más tarde, se sacrificaron las ratas en una cámara saturada de CO₂ y se enucleó el ojo derecho lesionado. Las retinas se aislaron, se aplanaron en un portaobjetos y se fijaron con medio de montaje basado en xileno.

50 Las retinas en montaje completo se evaluaron con un microscopio de fluorescencia. Las células teñidas se contaron manualmente. El número promedio de RGC por grupo se muestra en la Fig. 19, mostrando un número significativamente mayor de células en el grupo experimental con RPh-1.

Ejemplo 16. Modelo de desprendimiento de retina (RD).

55 Se realizó desprendimiento de retina (RD) en el ojo derecho de animales profundamente anestesiados (xilacina 50 mg/kg y ketamina 35 mg/kg) después de la dilatación de la pupila con gotas de tropicamida al 0,5 %. Se indujo RD a través de la generación de una pequeña abertura en la retina en la ora serata seguida de una inyección subretiniana de 5 μ l de solución salina con una aguja de jeringa de 30 G. Aproximadamente la mitad del área de la retina fue separada por este procedimiento.

5 Las ratas con RD se dividieron en dos grupos de experimentación, el grupo experimental recibió una inyección subdérmica en el área del cuello posterior de RPh-1 (5 % en aceite de semilla de algodón; 0,025 ml/inyección), y el grupo de control se inyectó con volumen de vehículo. La primera inyección se administró a todos los animales directamente después de la cirugía. La segunda inyección (la misma dosis y el procedimiento de administración) se administró 48 horas después de la cirugía.

En los días 3 y 14 días después de RD, las ratas operadas se sacrificaron en una cámara saturada de CO₂. El ojo derecho lesionado y el ojo izquierdo no tratado fueron enucleados. Las retinas se aislaron, se congelaron en hielo seco y se procesaron para análisis mediante inmunoelectrotransferencia o análisis inmunohistoquímico. Las retinas del ojo izquierdo sirvieron como controles no operados.

10 Se estudiaron los niveles de expresión de Semaforina 3A (Sema3A), Neuropilina 1 (NP1) y GAP43, se usó Caspasa3 como marcador apoptótico y se examinaron los cambios morfológicos en las células de Müller y microgliales.

15 Sema3A es un inhibidor del crecimiento axonal que se ha demostrado que está implicado en la pérdida de células ganglionares de la retina después de una lesión en el nervio óptico. Se detectaron niveles altos de Sema3A en las retinas después de la RD, como se muestra en el análisis por inmunoelectrotransferencia (Fig. 20A). El tratamiento con RPh-1 disminuyó claramente los niveles de expresión de Sema3A, tanto en las retinas de control no lesionadas como en aquellas con RD (Fig. 20A). Las muestras se normalizaron a la expresión de beta-actina (banda inferior, Fig. 20A).

20 El análisis inmunohistoquímico de secciones retinianas de 20 µm incubadas con anticuerpo anti-Sema3A y el tinte nuclear Sytox Blue mostró que la expresión de Sema3A fue claramente mayor en las retinas desprendidas en comparación con los controles. La expresión de Sema3A se observó principalmente alrededor de las células ganglionares de la retina. De forma similar a los resultados observados en el análisis por inmunoelectrotransferencia, la expresión de Sema3A se redujo en los animales RD tratados con RPh-1.

25 NP1 es un receptor funcional Sema3A. Las células positivas para TUNEL, que indicaban procesos apoptóticos, fueron evidentes 24 horas después del desprendimiento de retina y aumentaron después de 7 días.

La caspasa-3 se activó en respuesta al RD. Sin embargo, la caspasa-3 se elevó significativamente en animales con RD tratados con RPh-1 (Fig. 20B).

30 GAP43 es una proteína intracelular que está estrechamente conectada a la membrana de los conos de crecimiento. Normalmente se expresa durante el proceso de sinaptogénesis. En la retina, GAP43 se expresa en las neuronas en una etapa temprana de la embriogénesis, mientras que el nervio óptico aún se está alargando. En el nervio óptico de rata, GAP43 se encuentra tanto en los axones como en los cuerpos celulares de los RGC, pero la expresión desaparece a la edad de 8 a 16 semanas, y se encuentra nuevamente después de la isquemia o lesión del nervio óptico.

35 Los cambios morfológicos de las células de Muller se estudiaron mediante la tinción de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). GFAP marca las células de Muller en la retina, y se usa comúnmente como un indicador de estrés. El marcado con GFAP en la retina de control intacto se concentró en el GCL. El análisis inmunohistoquímico mostró niveles elevados de GFAP en las retinas desprendidas en comparación con los controles. Las retinas separadas tratadas con RPh-1 presentaron niveles más altos de GFAP.

40 La invasión y activación de microbios se consideran dañinos o beneficiosos para las neuronas. La activación microglial después de una lesión aguda del SNC es principalmente una respuesta reactiva y adaptativa de las células gliales, que se desencadena por neuronas lesionadas y que está diseñada para mejorar el daño tisular primario y promover la reparación subsiguiente y la gliosis (cicatriz glial) como resultado. La microglia se activa en la retina, generalmente después de la lesión, estimula y recluta las células endoteliales y los fibroblastos. El análisis inmunohistoquímico de secciones de retinas desprendidas y no dañadas marcadas con IB4 y teñidas con el tinte nuclear PI mostró evidencia de células microgliales activadas solo en retinas desprendidas. Sin embargo, en las retinas desprendidas de animales tratados con RPh-1, fue menos evidente la activación microglial en comparación con las retinas desprendidas de animales que fueron tratados con vehículo.

Los resultados mostraron una reducción en el reclutamiento de microglia activa alrededor de una región lesionada y un mecanismo de reparación de cicatrices sin cicatrices.

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

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 mirceno polimérico. 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 mirceno polimérico con β -HPCD se realizará de la siguiente manera:

- 5 a. Disolución de la fracción de mirceno polimérico 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.
- e. Disolución con sonicación y calentamiento.
- 10 f. Filtración a través de un filtro de 0,2-0,45 μ m.

Ejemplo 18. Preparación de nanoemulsiones de mirceno polimérico.

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 mirceno polimérico 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, tal como mirceno polimérico.

1. Preparación de la fase oleosa

La fase oleosa está compuesta de un 13 % de lipoide 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 mirceno polimérico preparado 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, al 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

30 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.

35 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

45 Filtración en condiciones asepticas de la nanoemulsión a viales estériles usando un filtro estéril PES de 0,2 μ m y almacenamiento a 40 °C.

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

- Un procedimiento conveniente para fabricar el producto de mezcla de mirceno polimérico-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. El mirceno polimérico 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 preparó 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 vierte 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 seca la mezcla por pulverización usando el secador por pulverización Yamato Pulvis® GA32. Las condiciones 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 mirceno polimérico-lípido.
- Se espera que la formulación de la mezcla de mirceno polimérico-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 de mirceno polimérico con una buena biodisponibilidad oral.

Ejemplo 20. Preparación de preparaciones liposomales que contiene mirceno polimérico.

- Se disolvieron lípidos que contenían mircenos poliméricos en 100 ml de diclorometano en un matraz de fondo redondo y agitar durante 30 min a temperatura ambiente hasta que se obtuvo una solución límpida transparente. Se evaporó el disolvente usando una unidad de evaporación rotatoria a 39 °C. En primer lugar, se hará rotar el 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 forme una dispersión uniforme y lechosa del vehículo multilamelar (MLV) y no quede ninguna película lipídica restante. Para obtener una preparación de liposomas equilibrada y homogénea, el matraz se agitará adicionalmente a 37 °C durante 30-90 min a 270 rpm.

Ejemplo 21. Preparación de microemulsiones que contienen mircenos poliméricos.

- 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 son 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 mirceno polimérico disolviendo los mircenos poliméricos 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 se coloca 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 que contienen mircenos poliméricos 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 fracción aislada de almáciga **caracterizada por que**
 es soluble en al menos un disolvente orgánico polar y en al menos un disolvente orgánico no polar, y
 está sustancialmente desprovista de compuestos que sean solubles en dicho disolvente orgánico polar pero
 insolubles en dicho disolvente orgánico no polar, en la que la fracción aislada 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,
- (e) aislar una fracción soluble en dicho disolvente orgánico no polar; y
- (f) opcionalmente, retirar dicho disolvente orgánico no polar;
- en el que las etapas (d) a (f) pueden preceder a las etapas (a) a (c); preferentemente
 en el que dicho procedimiento comprende además la etapa de fraccionar por tamaño la fracción obtenida
 en la etapa (c) o la etapa (f), o
 en el que cualquiera o ambas de las etapas (c) y (f) comprenden retirar el disolvente por un medio
 seleccionado del grupo que consiste en evaporación rotatoria, aplicación de alto vacío y una combinación
 de los mismos, o
 en el que dicho procedimiento comprende además repetir las etapas (a) a (c) y/o las etapas (d) a (f) para
 una multiplicidad de ciclos.
2. La fracción aislada de acuerdo con la reivindicación 1,
 en la que el al menos un disolvente orgánico polar se selecciona del grupo que consiste en un alcohol, un
 éter, un éster, una amida, un aldehído, una cetona, un nitrilo y combinaciones de los mismos, preferentemente
 en la que el disolvente orgánico polar se selecciona del grupo consistente en 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, más preferentemente en el que al menos un disolvente orgánico polar es etanol; o
 en el que el al menos un disolvente orgánico no polar se selecciona del grupo que consiste en hidrocarburos
 alifáticos acíclicos o cíclicos, saturados o insaturados e hidrocarburos aromáticos, cada uno de los cuales
 está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, y combinaciones de los mismos, preferentemente
 en el que el disolvente orgánico polar se selecciona del grupo que consiste en alcanos C5-C10, cicloalcanos
 C5-C10, hidrocarburos aromáticos C6-C14 y perfluoroalcanos C7-C14, y combinaciones de los mismos, más
 preferentemente en el que el disolvente orgánico no polar se selecciona del grupo que consiste en pentanos,
 hexanos, heptanos, octanos, nonanos, decanos, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, benceno, tolueno,
 xileno e isómeros y mezclas de los mismos, incluso más preferente en el el disolvente orgánico no polar
 es hexano; o
 en el que el disolvente orgánico polar comprende etanol y el disolvente orgánico no polar comprende hexano;
 o
 en el 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*; o
 en el que la fracción está sustancialmente desprovista de compuestos terpénicos que son solubles en dicho
 disolvente orgánico polar e insolubles en dicho disolvente orgánico no polar, preferentemente en el que
 dichos compuestos terpénicos son compuestos terpénicos monoméricos.
3. Una composición que consiste en la fracción aislada de acuerdo con la reivindicación 1, y un vehículo o
 excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la fracción aislada de almáciga está en el intervalo de un 0,01 a un 25 % (p/p) en base al peso total de la composición.
5. Una composición que consiste en la fracción aislada de acuerdo con la reivindicación 1, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y de un 0,01 a un 25 % (p/p) de mirceno polimérico, en base al peso total de la composición.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5,
- en la que el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en número de al menos 800, y en la que el mirceno polimérico tiene un grado de pureza de al menos un 80 %, preferentemente en la que el grado de pureza es al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %; o
- en la que el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en número de al menos 1000, preferentemente en la que el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en número de al menos 5000, y más preferentemente en la que el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en número de 5000 a 20 000; o
- en la que el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en número de al menos 1000 y el mirceno polimérico tiene un grado de pureza de al menos un 90 %; o
- en la que el mirceno polimérico es un producto de una síntesis química, o se deriva de una fuente vegetal; o
- en la que el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en número en el intervalo de al menos 1000 a 50 000, preferentemente en la que el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en número en un intervalo seleccionado del grupo que consiste en: al menos 1000 a 10 000; al menos 1000 a 20 000; 5000 a 10 000; 5000 a 20 000; 10 000 a 15 000; 15 000 a 30 000; 25 000 a 40 000; 35 000 a 50 000; e intervalos intermedios de los mismos.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 3,
- en la que el vehículo es un vehículo hidrófobo que se selecciona 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; o
- que está en una forma adecuada para la administración cosmética o dermatológica; o
- que está en una forma adecuada para la administración por una ruta seleccionada del grupo que consiste en oral, tópica, parenteral, intramuscular, subcutánea, intradérmica, vaginal, rectal, intracraneal, intranasal, intraocular, auricular, pulmonar, intralesional, intraperitoneal, intraarterial, intracerebral, intracerebroventricular, intraósea e intratecal; o
- que está en una forma adecuada para la administración por inyección; o
- que comprende al menos uno de un complejo de inclusión, una nanoemulsión, una microemulsión, una micropartícula lipídica y un dendrímero, preferentemente en la que el complejo de inclusión comprende al menos una ciclodextrina, o en la que la nanoemulsión comprende gotículas que tienen un tamaño de partícula promedio menor de 800 nm, o en la que la microemulsión comprende al menos un tensioactivo no iónico, más preferentemente en la que el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en un aceite de ricino polietoxilado, un éster de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno (polisorbatos), un poloxámero, un derivado de la vitamina E, un éter alquílico de polioxietileno, un estereato de polioxietileno, un glicerido poliglicolizado saturado o combinaciones de los mismos.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 5,
- en la que el vehículo es un vehículo hidrófobo que se selecciona 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; o
- que está en una forma adecuada para la administración cosmética o dermatológica; o
- que está en una forma adecuada para la administración por una ruta seleccionada del grupo que consiste en oral, tópica, parenteral, intramuscular, subcutánea, intradérmica, vaginal, rectal, intracraneal, intranasal, intraocular, auricular, pulmonar, intralesional, intraperitoneal, intraarterial, intracerebral, intracerebroventricular, intraósea e intratecal; o

que está en una forma adecuada para la administración por inyección; o

5 que comprende al menos uno de un complejo de inclusión, una nanoemulsión, una microemulsión, una micropartícula lipídica y un dendrímero, preferentemente en la que el complejo de inclusión comprende al menos una ciclodextrina, o en la que la nanoemulsión comprende gotículas que tienen un tamaño de partícula promedio menor de 800 nm, o en la que el liposoma comprende una vesícula multilamelar o en la que la microemulsión comprende al menos un tensioactivo no iónico, más preferentemente en la que el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en un aceite de ricino polietoxilado, un éster de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno (polisorbatos), un poloxámero, un derivado de la vitamina E, un éter alquílico de polioxietileno, un estereato de polioxietileno, un glicerido poliglicolizado saturado o combinaciones de los mismos.

10

9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-8,

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; o

15 para su uso en el tratamiento de un trastorno de la piel o del cuero cabelludo, preferentemente en el que el trastorno de la piel o el cuero cabelludo se selecciona del grupo que consiste en alopecia, eccema, psoriasis, queratosis seborreica y seborrea; o

20 para su uso en el tratamiento de daño tisular, preferentemente en el que el daño tisular está asociado con 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 infección y un procedimiento quirúrgico; o

25 para su uso en el tratamiento de una herida, preferentemente en el que la herida se selecciona del grupo que consiste en 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, una herida por punción, una herida de metralla, una dermoabrasión, una contusión, una infección, una herida y una herida quirúrgica.

30 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el mirceno polimérico es un producto de una síntesis química, o se deriva de una fuente vegetal, en la que el mirceno polimérico tiene un peso molecular promedio en número de al menos 800 hasta 50 000, y en la que el mirceno polimérico tiene un grado de pureza de al menos un 80 %.

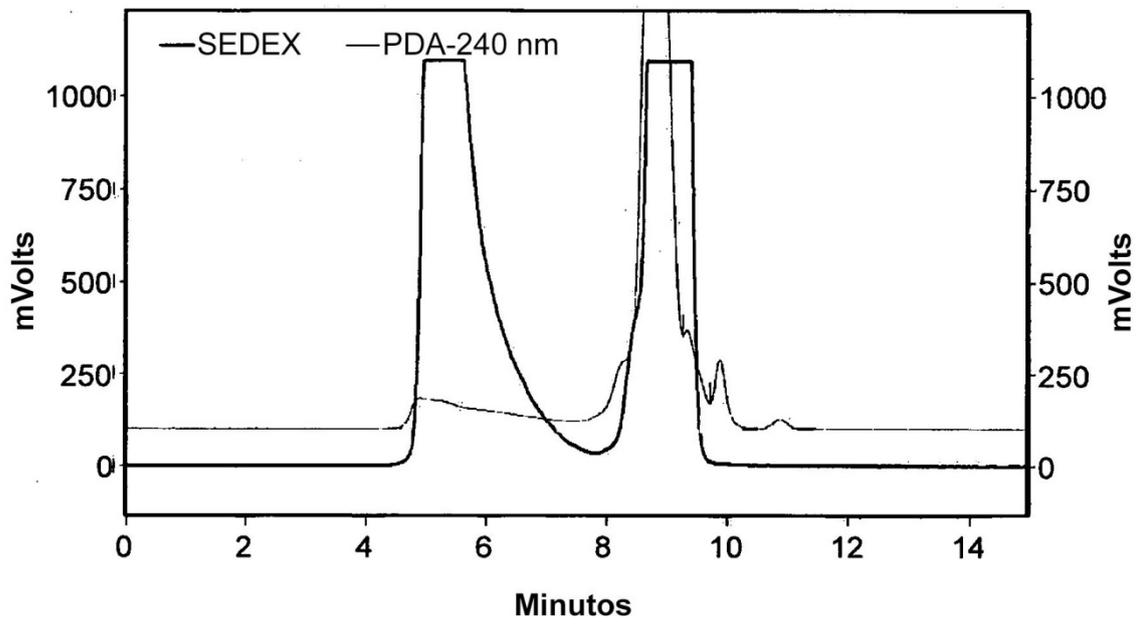


FIGURA 1

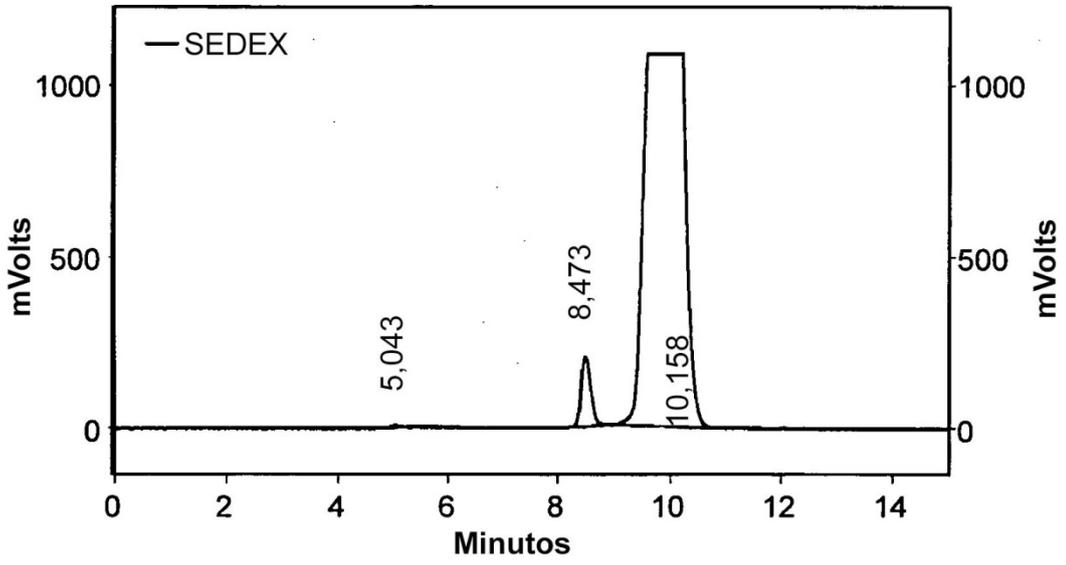


FIGURA 2A

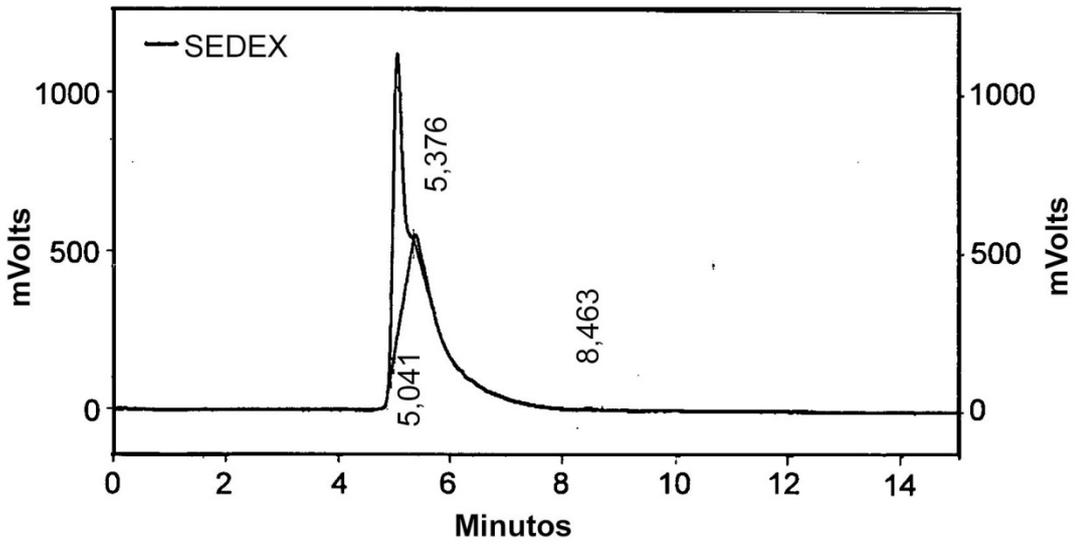


FIGURA 2B

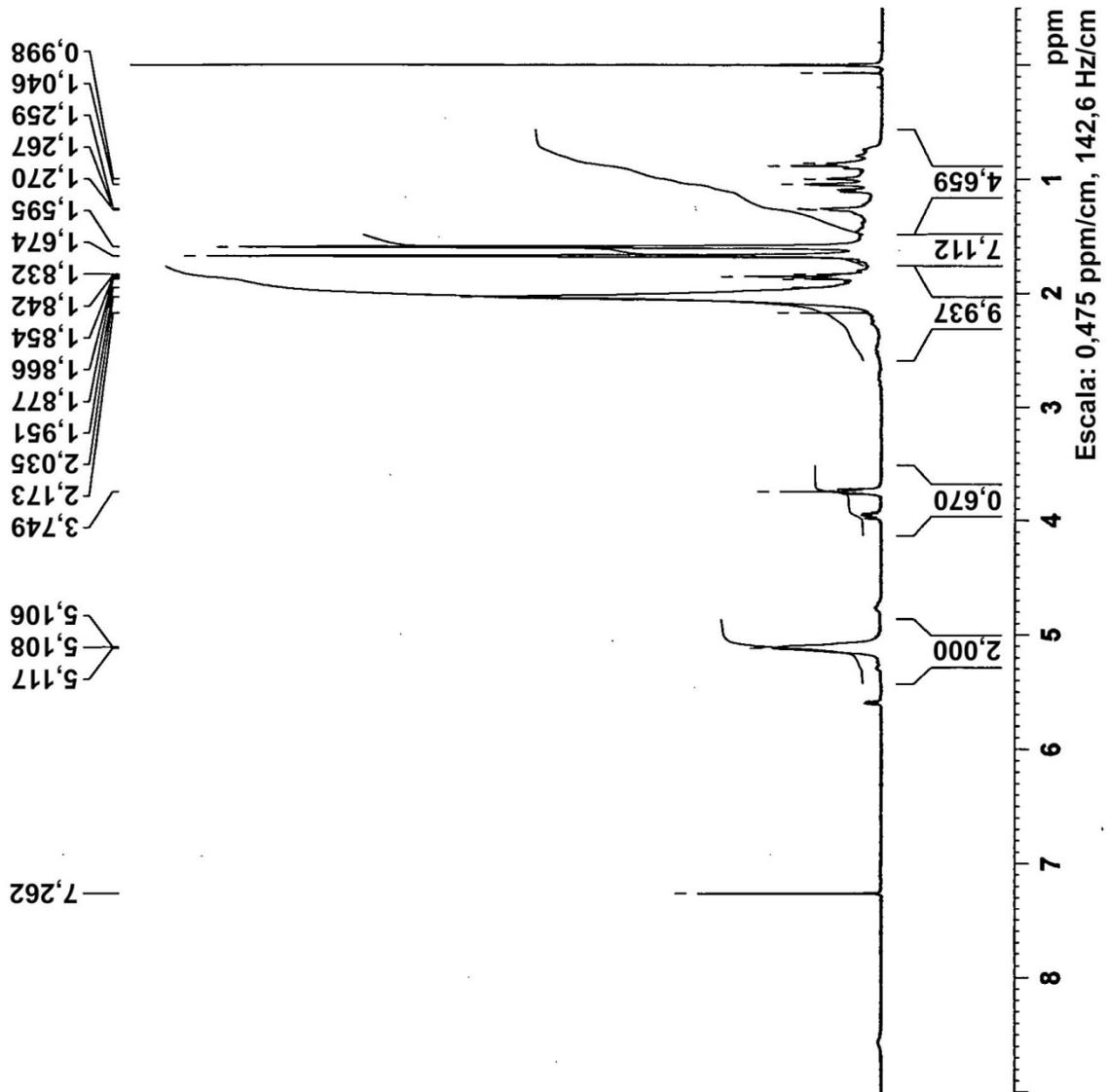


FIGURA 3

NOMBRE	J5K10.11.08
EXPNO	1
PROCNO	1
Fecha_	20081110
Hora	8,21
INSTRUM	spect
PROBHD	5 mm Dual 13C/
PULPROG	zg
TD	32768
DISOLVENTE	CDC13
NS	8
DS	0
SWH	4194,631 Hz
FIDRES	0,128010 Hz
AQ	3,9059956 s
RG	71,8
DW	119,200 us
DE	6,00 us
TE	297,2 K
D1	0,00100000 s
TD0	1
===== CANAL f1 =====	
NUC1	1H
P1	9,00 us
PL1	-3,0 dB
SFO1	3,001319000 MHz
SI	32768
SF	300,1300055 MHz
WDW	EM
SSB	0
LB	0,00 Hz
GB	0
PC	0,50

FIGURA 3, CONTINUACIÓN

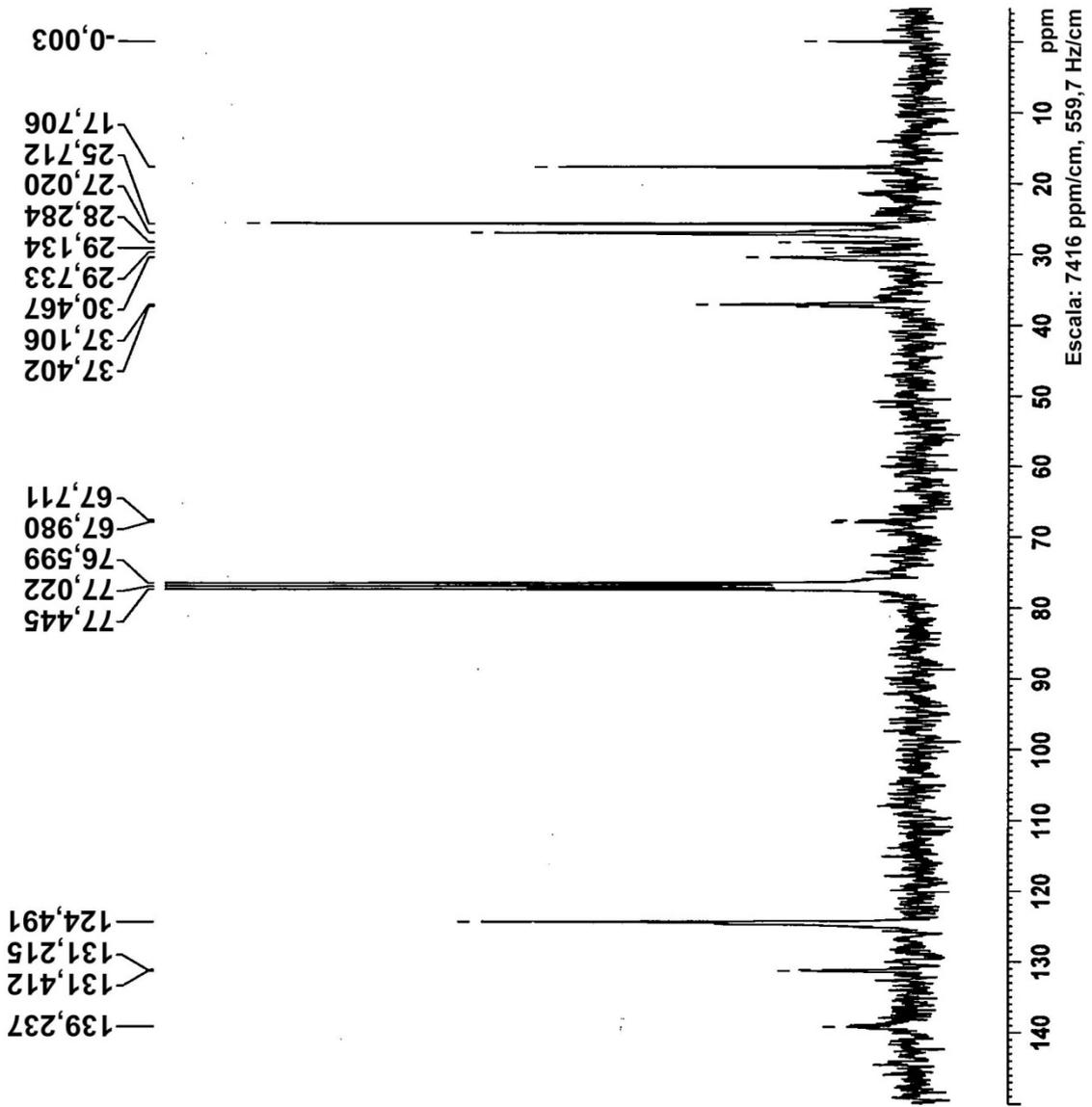


FIGURA 4

ES 2 739 033 T3

```

NOMBRE          J5K10.11.08
EXPNO           2
PROCNO          1
Fecha_         20081110
Hora_          8,26
INSTRUM         spect
PROBHD         5 mm Dual 13C/
PULPROG         zgdc
TD             32768
DISOLVENTE     CDC13
NS             1808
DS             0
SWH            19723,865 Hz
FIDRES         0,601925 Hz
AQ            0,8307188 s
RG            5792,6
DW            25,350 us
DE            9,46 us
TE            297,2 K
D1            0,10000000 s
d11           0,03000000 s
TD0           1
===== CANAL f1 =====
NUC1           13C
P1             3,00 us
PL1           -5,00 dB
SFO1          75,4759867 MHz
===== CANAL f2 =====
CPDPRG2       waltz16
NUC2           1H
PCPD2         100,00 us
PL2           -6,00 dB
PL12          12,00 dB
SFO2          300,1312000 MHz
SI            32768
SF            75,4677482 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            5,00 Hz
GB            0
PC            1,00
    
```

FIGURA 4, CONTINUACIÓN

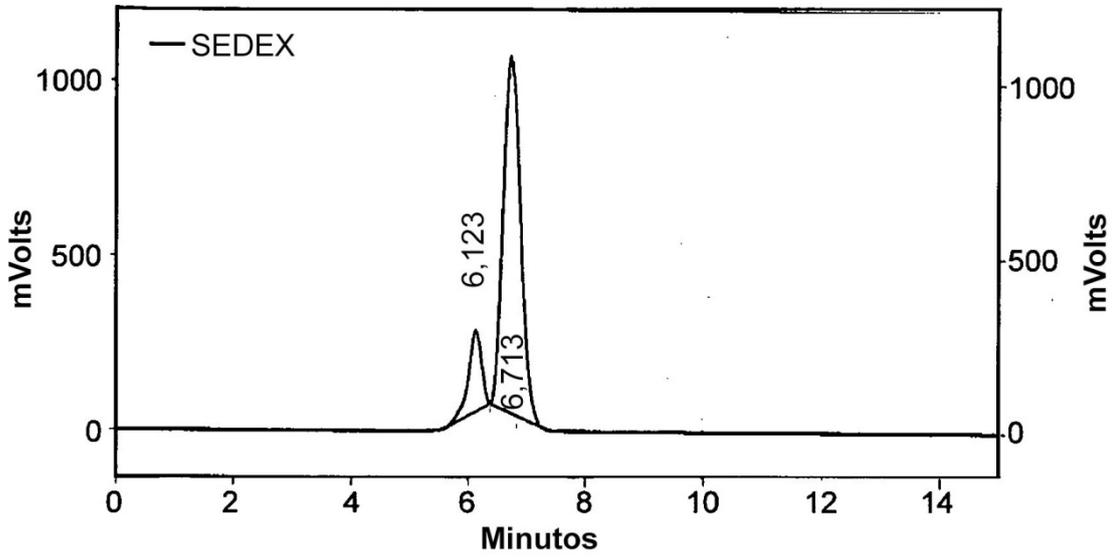


FIGURA 5A

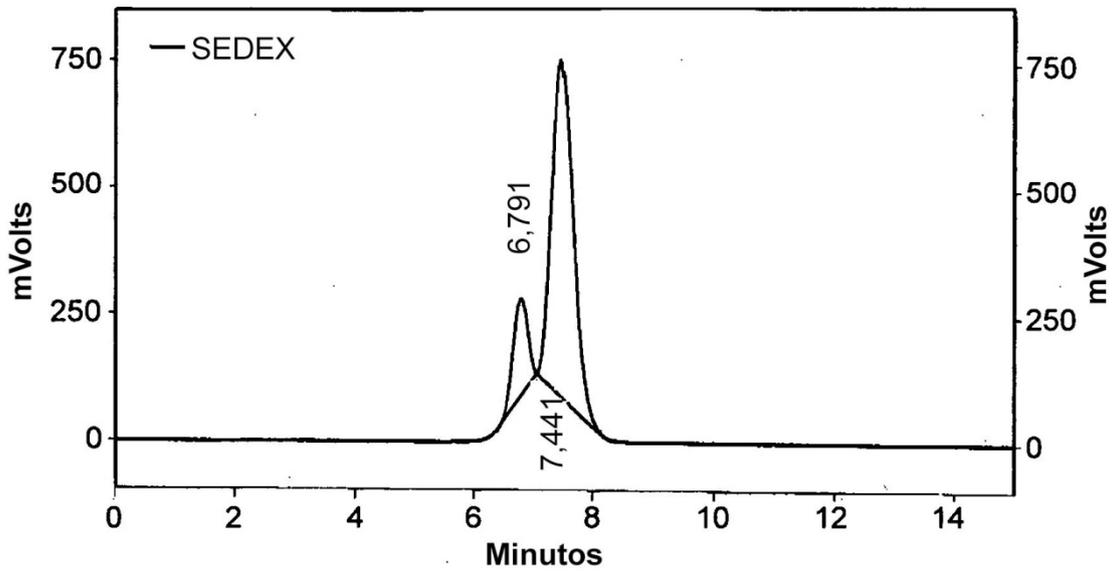


FIGURA 5B

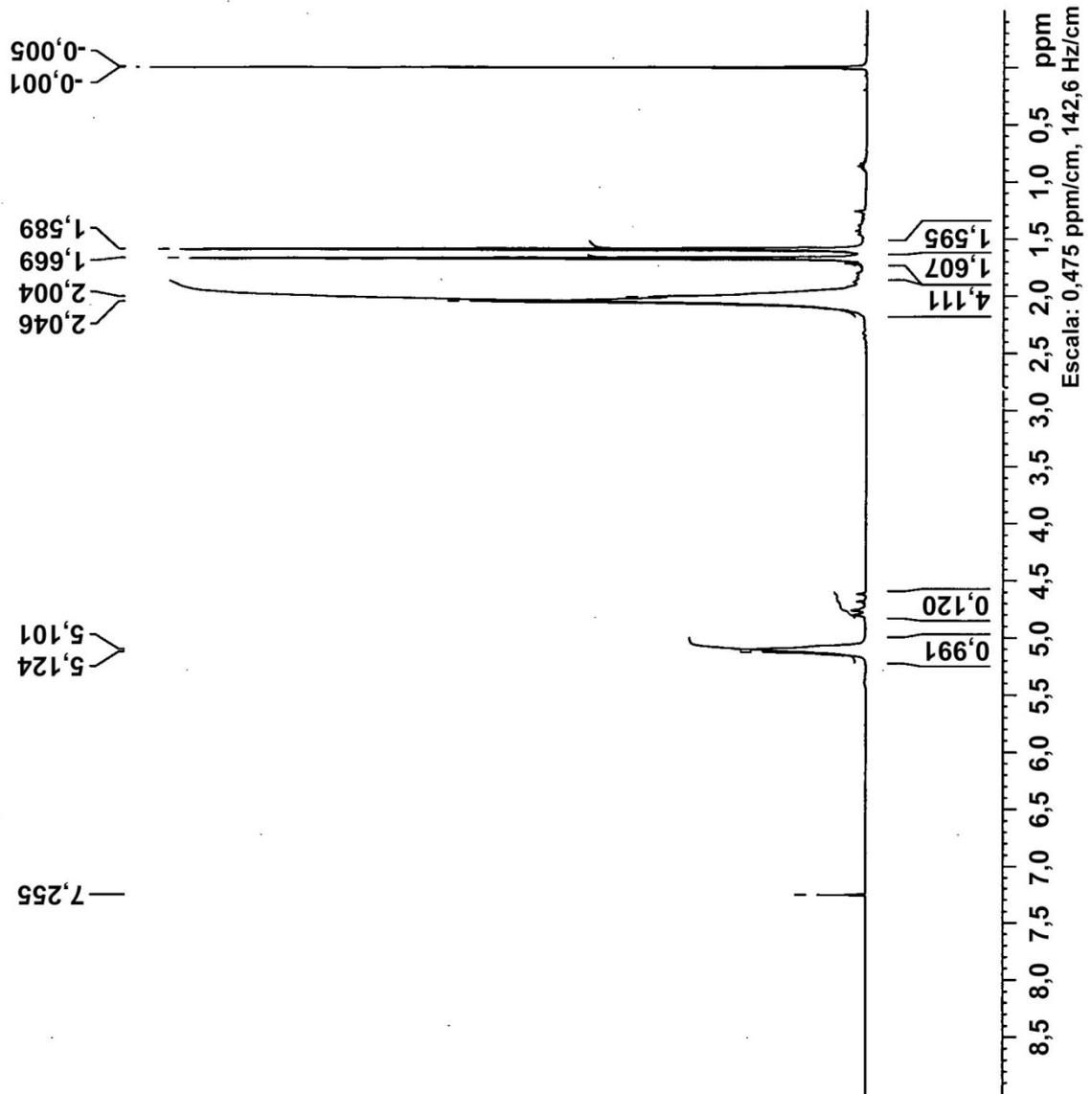


FIGURA 6

ES 2 739 033 T3

NOMBRE J5K17.12.08
EXPNO 2
PROCNO 1
Fecha_ 20081217
Hora 9,06
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg
TD 32768
DISOLVENTE CDC13
NS 24
DS 0
SWH 4194,631 Hz
FIDRES 0,128010 Hz
AQ 3,9059956 s
RG 71,8
DW 119,200 us
DE 6,00 us
TE 297,2 K
D1 0,00100000 s
TD0 1

===== CANAL f1 =====

NUC1 1H
P1 9,00 us
PL1 -3,00 dB
SFO1 300,1319000 MHz
SI 32768
SF 300,1300075 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0,00 Hz
GB 0
PC 0,50

FIGURA 6, CONTINUACIÓN

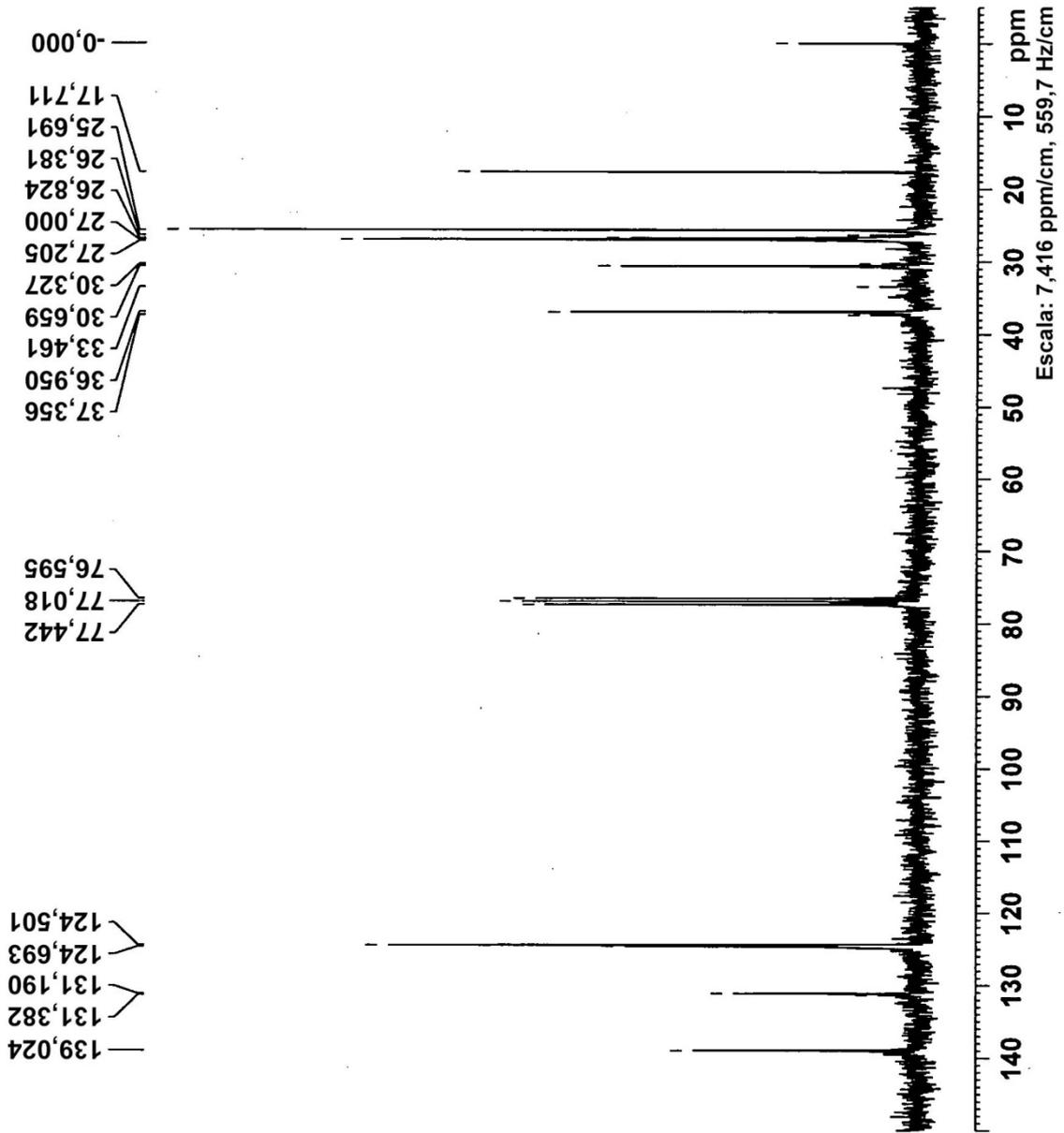


FIGURA 7

ES 2 739 033 T3

```

NOMBRE      J5K17.12.08
EXPNO              3
PROCNO              1
Fecha_          20081217
Hora              9,11
INSTRUM          spect
PROBHD  5 mm Dual 13C/
PULPROG          zgdc
TD                32768
DISOLVENTE      CDC13
NS                442
DS                0
SWH              19723,865 Hz
FIDRES           0,601925 Hz
AQ               0,8307188 s
RG                5792,6
DW                25,350 us
DE                9,46 us
TE                297,2 K
D1               0,10000000 s
d11              0,03000000 s
TD0              1
===== CANAL f1 =====
NUC1            13C
P1                3,00 us
PL1              -5,00 dB
SFO1            75,4759867 MHz
===== CANAL f2 =====
CPDPRG2         waltz16
NUC2              1H
PCPD2            100,00 us
PL2              -6,00 dB
PL12             12,00 dB
SFO2            300,1312000 MHz
SI                32768
SF               75,4677483 MHz
WDW              EM
SSB              0
LB                2,00 Hz
GB              0
PC                1,00

```

FIGURA 7, CONTINUACIÓN

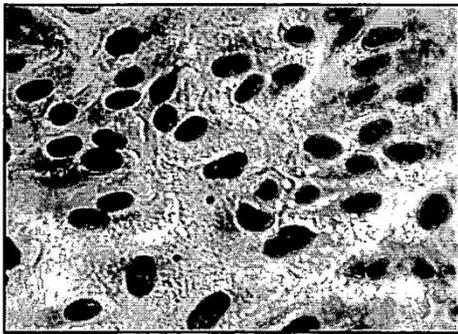


FIGURA 8A

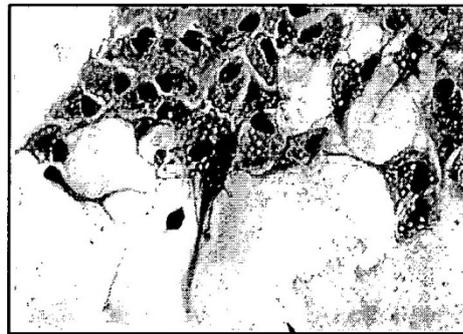


FIGURA 8B

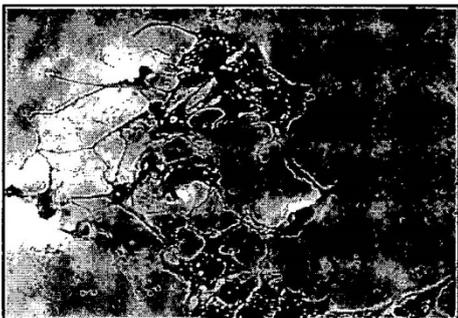


FIGURA 8C

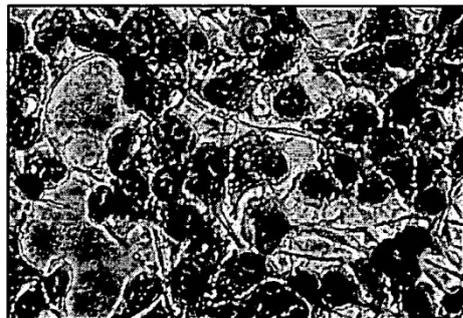


FIGURA 8D

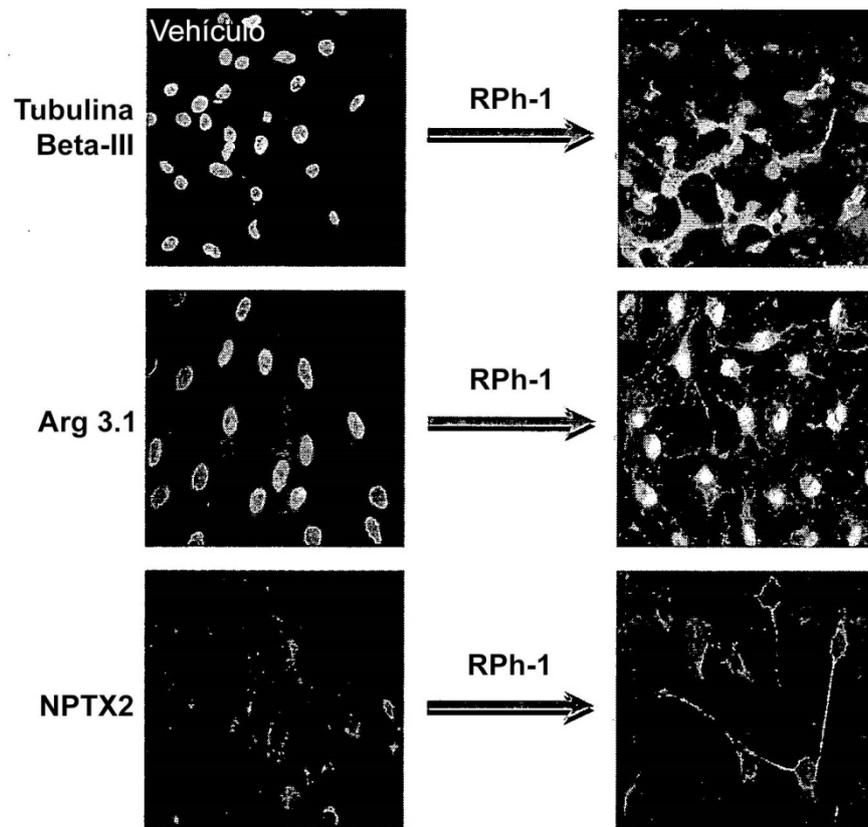


FIGURA 9

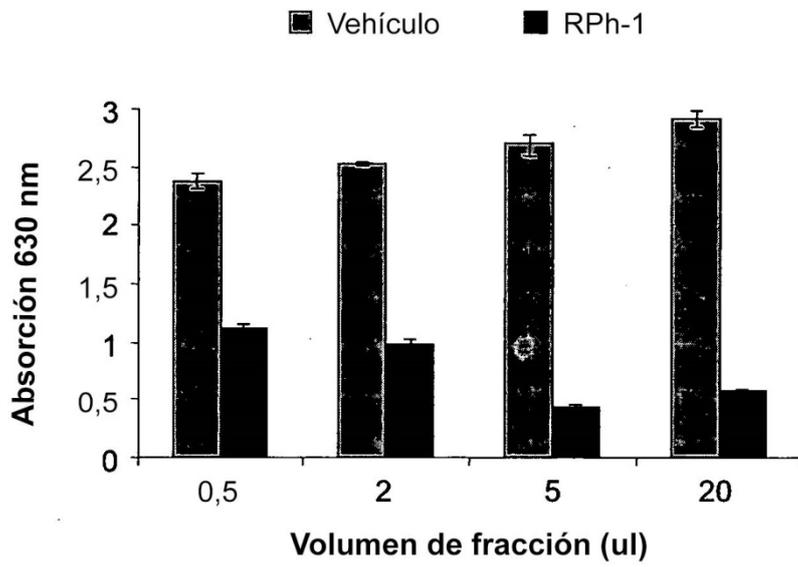


FIGURA 10



FIGURA 11A

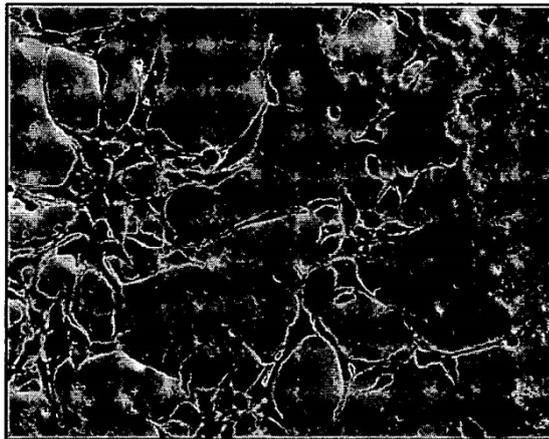


FIGURA 11B

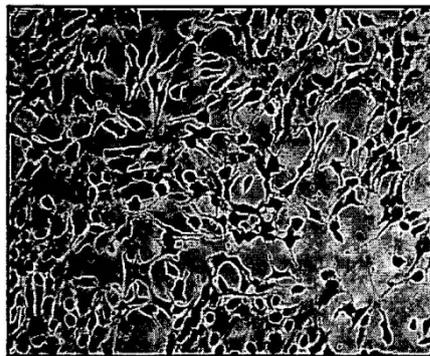


FIGURA 11C

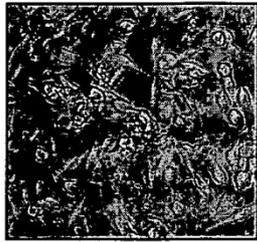


FIGURA 12A

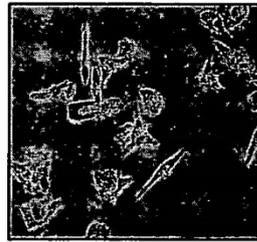


FIGURA 12B

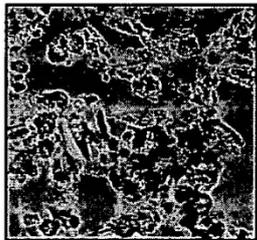


FIGURA 12C

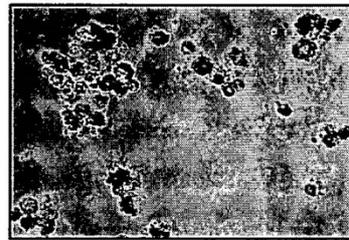


FIGURA 12D

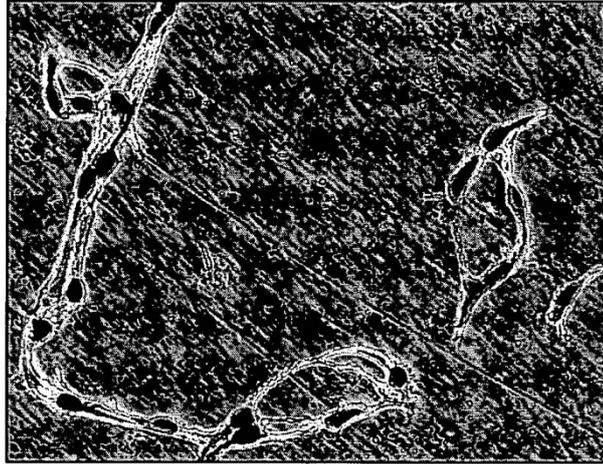


FIGURA 13A

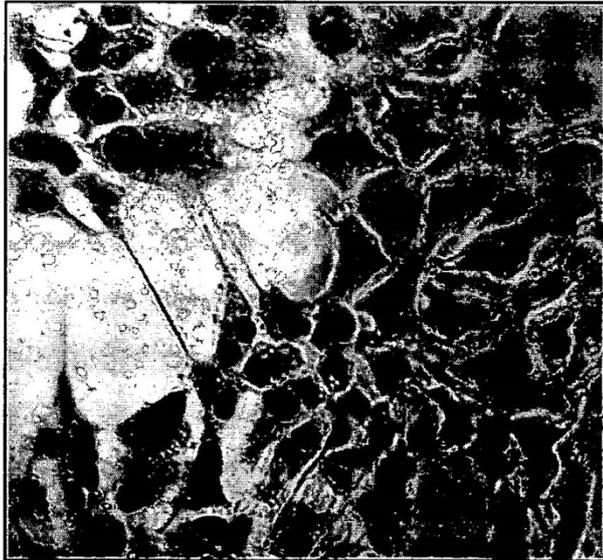


FIGURA 13B



FIGURA 14A

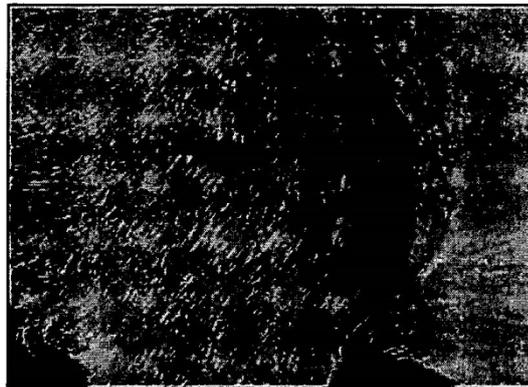


FIGURA 14B

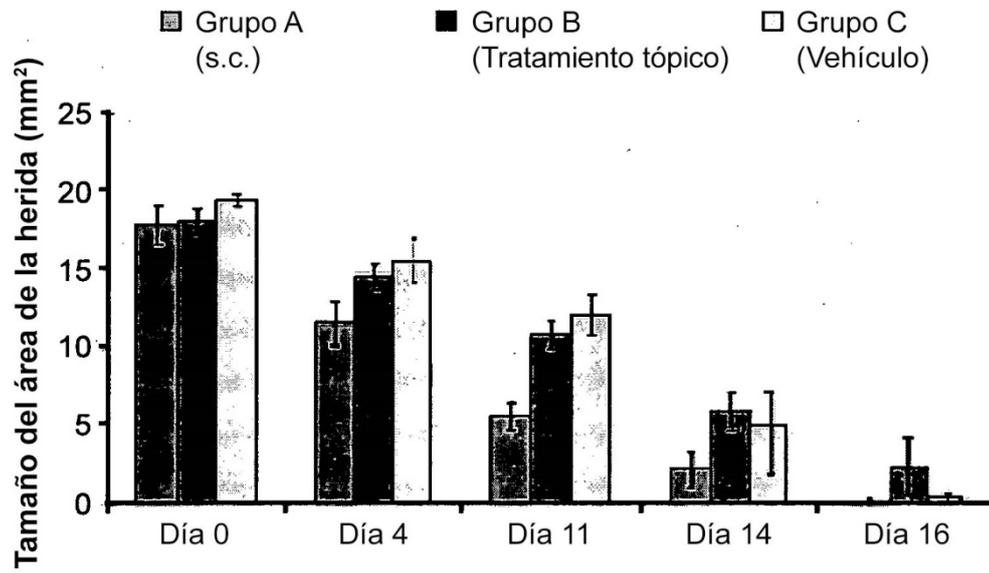


FIGURA 15

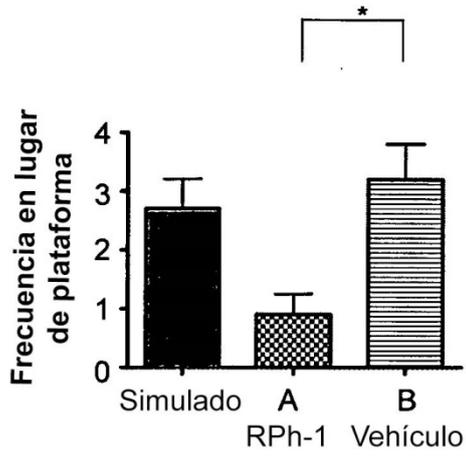


FIGURA 16A

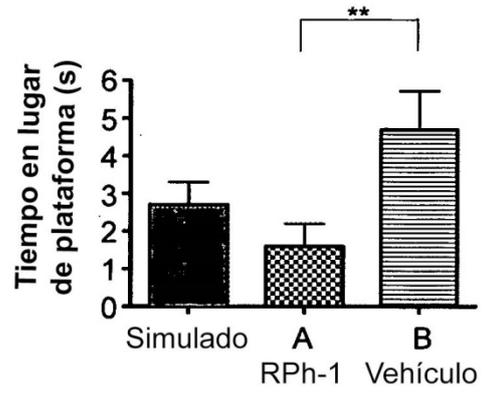


FIGURA 16B

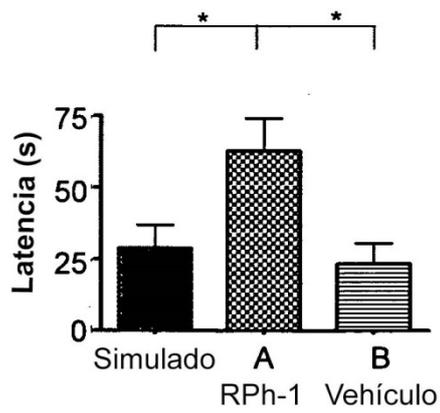


FIGURA 16C

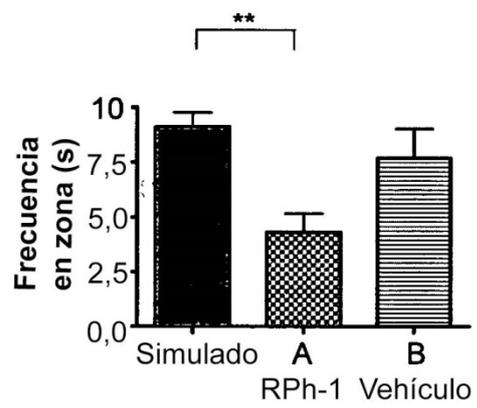


FIGURA 16D

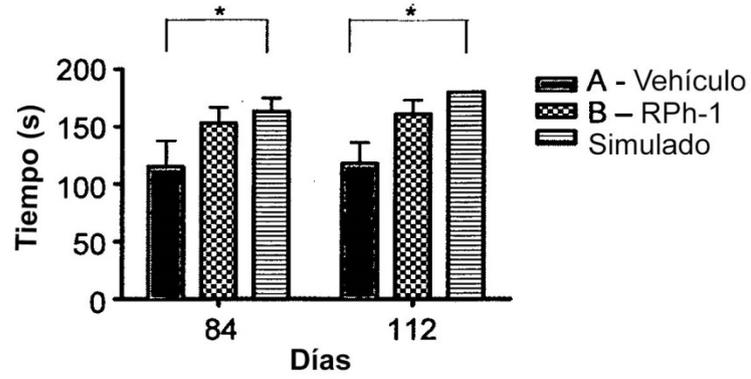


FIGURA 16E

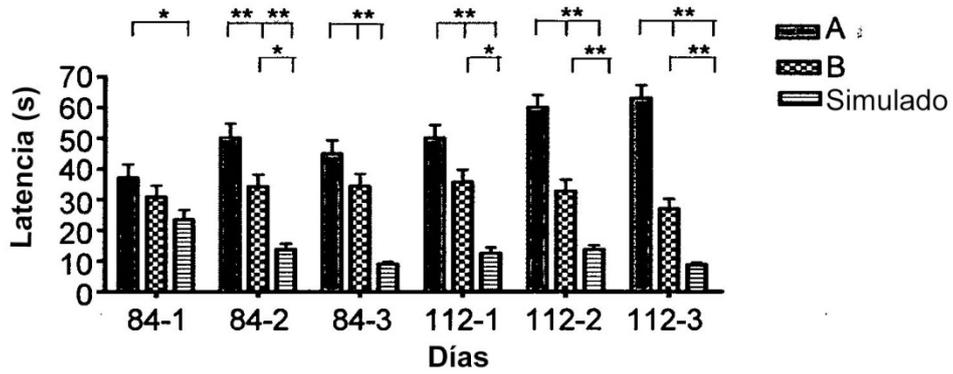


FIGURA 16F

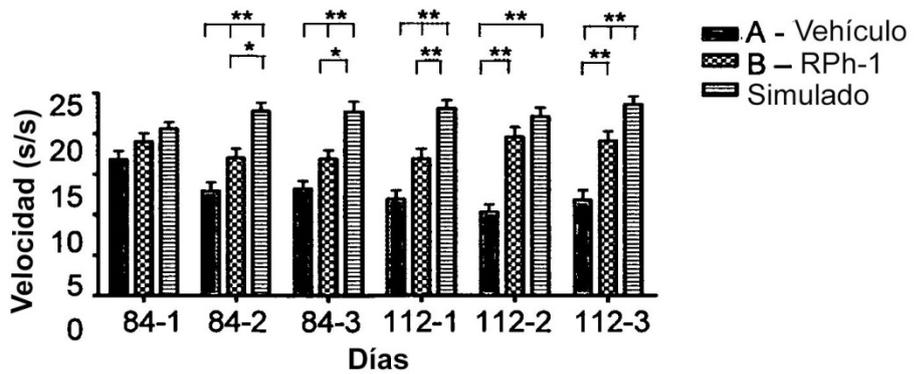


FIGURA 16G

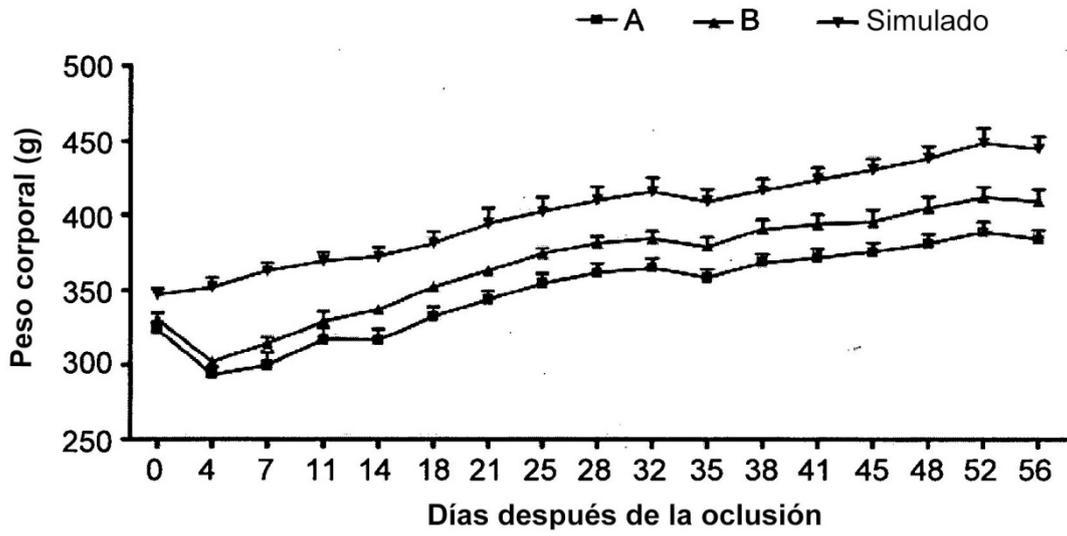


FIGURA 17A

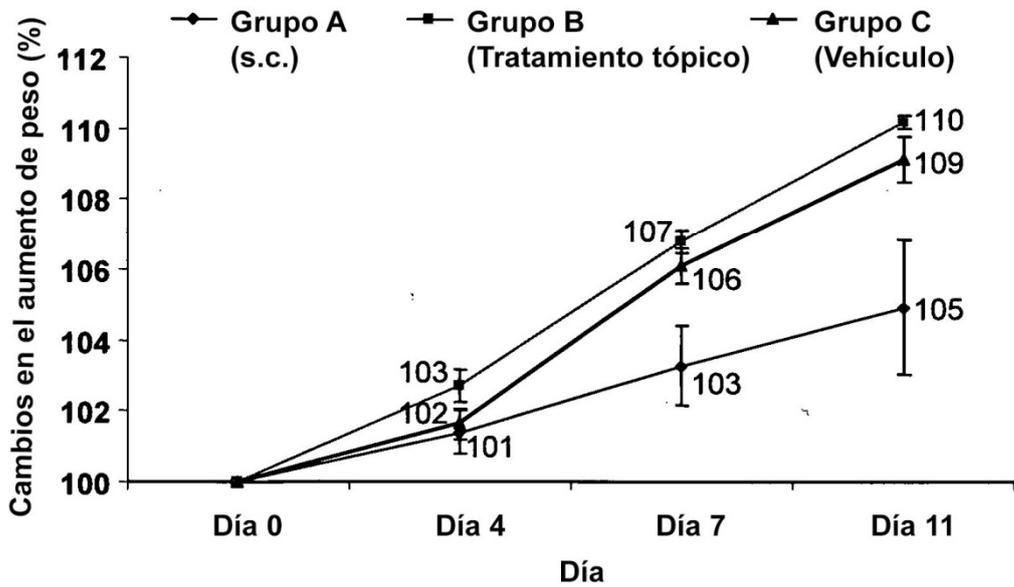


FIGURA 17B

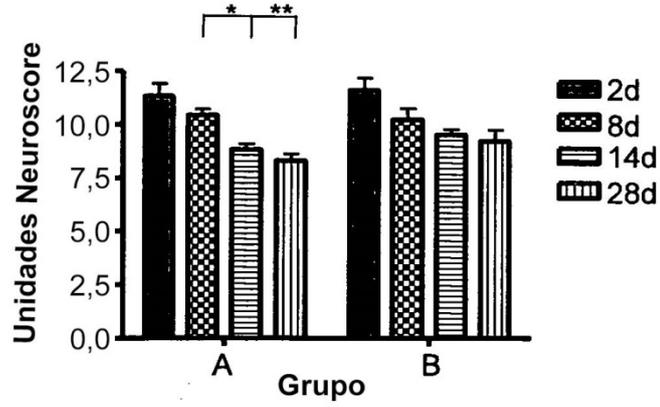


FIGURA 18A

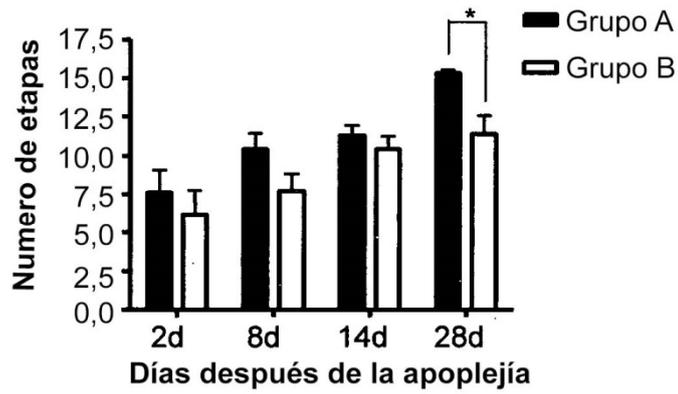


FIGURA 18B

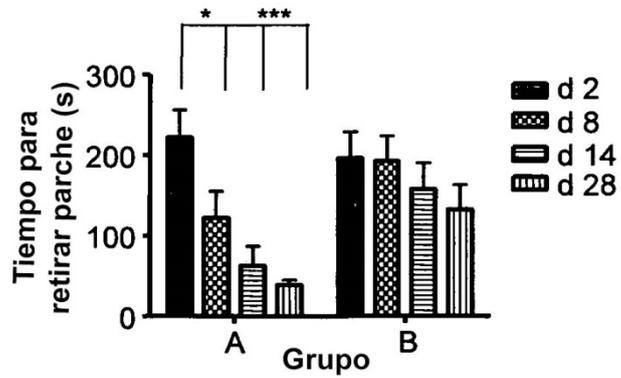


FIGURA 18C

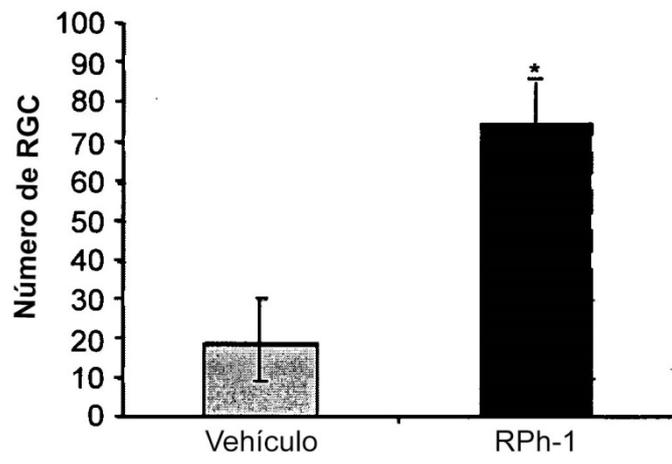


FIGURA 19

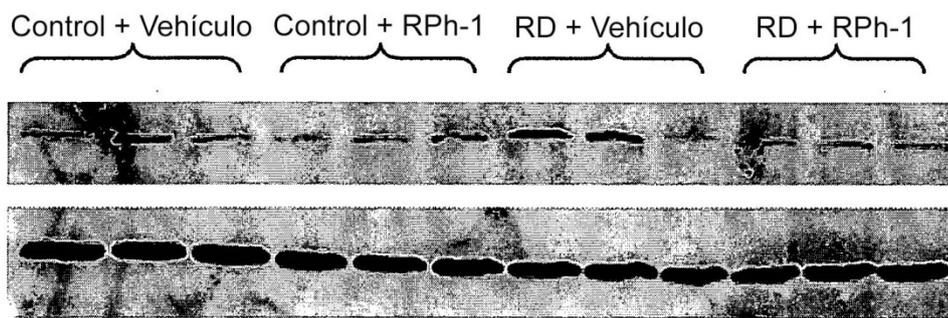


FIGURA 20A

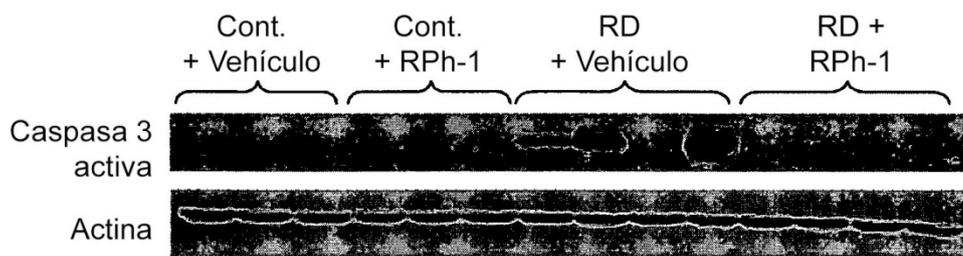


FIGURA 20B