



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 568**

51 Int. Cl.:
A61K 36/23 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03815106 .4**

96 Fecha de presentación : **10.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1569672**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.09.2005**

54 Título: **Uso de un extracto de *Centella asiatica* rico en madecasósido y en terminolósido.**

30 Prioridad: **10.12.2002 FR 02 15613**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.11.2009

73 Titular/es: **Bayer Consumer Care AG.**
Peter Merian-Strasse 84
4052 Basel, CH

72 Inventor/es: **Loiseau, Alain;**
Sene, Gérard y
Theron, Eric

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 329 568 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

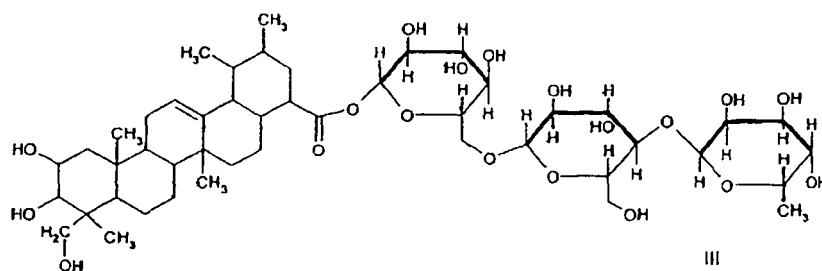
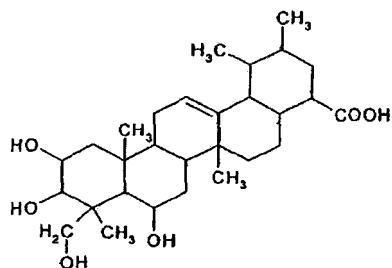
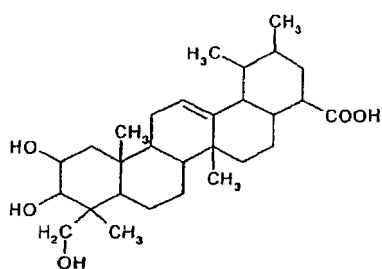
Uso de un extracto de *Centella asiatica* rico en madecasósido y en terminolósido.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un extracto que comprende una mezcla de madecasósido, de terminolósido y, llegado el caso, de asiaticósido, y al uso de un extracto de *Centella asiatica* que comprende una mezcla de madecasósido y de terminolósido para la preparación de un medicamento que tiene una actividad anti-inflamatoria.

10 *Centella asiatica*, también conocida con el nombre de Violeta marrón (Isla de la Reunión), de Gotu Kola o de Indian Pennywort (India) o de Centella remanda (América del norte) y de Talapetraka (Madagascar), es una hierba polimorfa que crece en estado salvaje en unas regiones húmedas y sombrías a una altitud ideal de 600 metros.

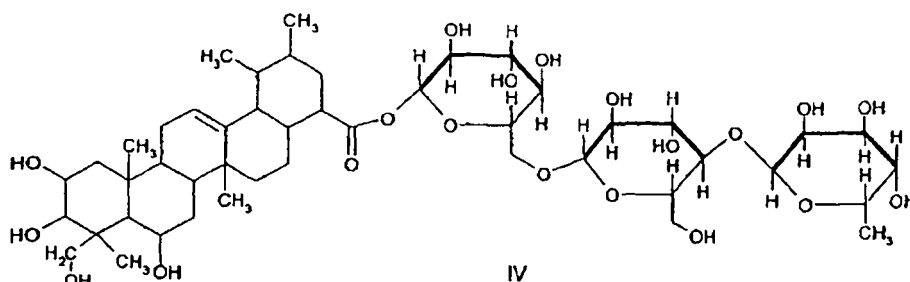
15 *Centella asiatica* pertenece a la familia de las umbelíferas (Apiáceas), particularmente a la sub-familia de los Hicrocotilos. *Centella* corresponde al nombre del género de la planta mientras que *asiatica* corresponde a su especie. *Centella asiatica* incluye tres variedades denominadas *Typica*, *Abyssinica* y *Floridana*. *Centella asiatica* es conocida y usada por las medicinas tradicionales malgache, india, china, amerindia o indonesia desde hace más de 3.000 años. Presenta unos usos variados y diversos según los países. Es particularmente interesante por sus propiedades cicatrizantes, sedativas, analgésicas, antidepresivas, antiviricas y antimicrobianas. Se usa generalmente por vía tópica o por
20 vía oral. Paradójicamente, la aparición de *Centella asiatica* en la medicina moderna occidental fue tardía, puesto que entró en el Codex únicamente en 1884, y el primer extracto seco se realizó únicamente en 1941.

25 Los agentes activos de *Centella asiatica* son unos triterpenos pentacíclicos, que se encuentran en el estado de geninas, los ácidos asiático (fórmula I) y madecásico (fórmula II), y de heterósidos, el asiaticósido (fórmula III) y el madecasósido (fórmula IV).



5

10



15

Las moléculas de asiaticósido, de madecasósido, de ácido asiático y de ácido madecásico participan en las defensas naturales de la planta. Para poder explotar industrialmente los agentes activos de *Centella asiatica* de manera satisfactoria, es indispensable por lo tanto recolectar la planta en el estado salvaje, siendo necesario un estrés medioambiental para que esta planta vivaz presente un contenido importante en triterpenos.

20

25

Los heterósidos de *Centella asiatica*, madecasósido y asiaticósido, son unos complejos azucarados que constituyen las formas de reserva del ácido madecásico y del ácido asiático de la planta, sintetizadas esencialmente, en época húmeda. La agresión de la planta por unas bacterias, unas levaduras o unos hongos activa las hidrolasas liberadoras de las geninas. Las moléculas triterpénicas son particularmente interesantes debido a su acción reguladora y activadora de la síntesis de colágenos. Las geninas y los heterósidos extraídos de *Centella asiatica* favorecen en particular la cicatrización, y en el tratamiento de la insuficiencia venosa. Se usan en el campo cosmético principalmente como agentes antiarrugas y anticelulitis. Los agentes activos de *Centella asiatica* usados más habitualmente en la técnica anterior son los ácidos asiático y madecásico, así como el asiaticósido. Siendo el madecasósido muy soluble en agua, es arrastrado lo más habitualmente en las aguas de lavado durante unos procedimientos de extracción habituales de los agentes activos liposolubles.

30

35

Los procedimientos de la técnica anterior permiten la obtención de una mezcla de asiaticósido y de madecasósido. Esta mezcla comprende aproximadamente 25% en peso de asiaticósido, 60% en peso de madecasósido y 15% en peso de productos secundarios, constituidos principalmente por ácidos grasos y por ósidis, con relación al peso total de la mezcla. Otros procedimientos de la técnica anterior permiten asimismo la obtención de madecasósido puro al 81% en peso con relación al peso total del extracto, comprendiendo dicho extracto además unos isómeros parecidos al madecasósido, unos ácidos grasos, principalmente unos ácidos linoleico, linoléico, palmítico u oleico, y unos azúcares tales como unos ósidis.

40

De manera sorprendente, el solicitante ha llevado a cabo un nuevo procedimiento de extracción que permite la obtención de una mezcla de madecasósido, de asiaticósido y de una nueva molécula que se ha denominado terminolósido, siendo dicha mezcla pura a más del 75% en masa con relación al peso total de la mezcla, y la obtención de una mezcla de madecasósido y de terminolósido obtenida pura a más del 95% en masa con relación al peso total de la mezcla. De la misma manera, el solicitante ha descubierto un extracto de *Centella asiatica* que comprende una mezcla de madecasósido, de terminolósido y, llegado el caso, de asiaticósido.

45

De manera sorprendente, el solicitante ha descubierto asimismo que la mezcla de madecasósido y de terminolósido extraída de las partes aéreas de *Centella asiatica* se podía usar en un medicamento que tiene una actividad anti-inflamatoria.

50

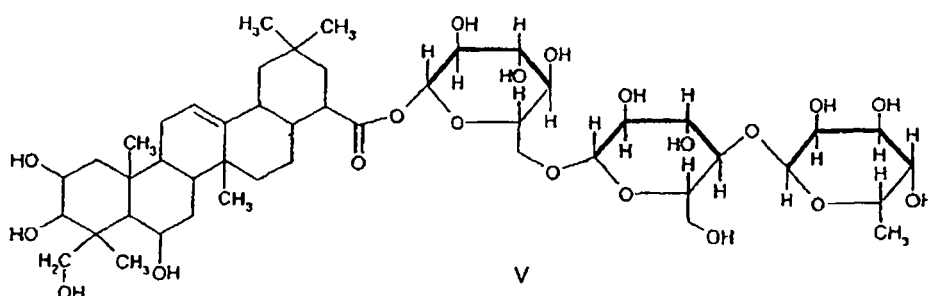
Además, la mezcla de madecasósido, de terminolósido y de asiaticósido extraída de las partes aéreas de *Centella asiatica* se puede usar en una composición cosmética para prevenir y retrasar el envejecimiento prematuro de la piel.

55

En el marco de la presente invención, se entenderá por terminolósido la molécula química de nombre general 2 α ,3 β ,6 β ,23-tetrahidroxiolea-12-eno-28-oato de 1[O- α -L-ramnopiranosil-(1-4)-O- β -glucopiranosol-(1-6)]-O- β -D-glucopiranosol y de fórmula V siguiente:

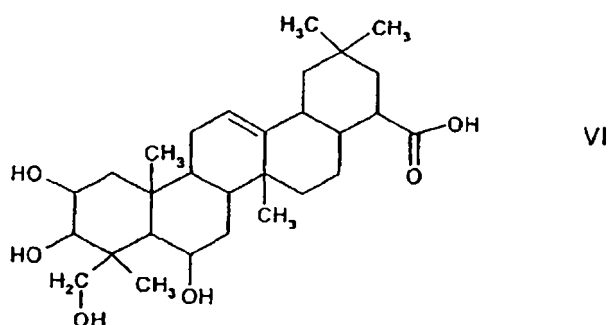
60

65



ES 2 329 568 T3

Esta molécula presenta la misma cadena azucarada que el madecasósido, a saber, una cadena glucosa-glucosa-ramnosa. La estructura del ciclo terpénico del terminolósido corresponde a la del ciclo terpénico del ácido terminólico, de fórmula VI siguiente:



20 El terminolósido es así un isómero de posición del madecasósido. Sahu *et al.*, 1989, describen el aislamiento de esta molécula en un extracto de *Centella asiatica*.

25 Se podría suponer asimismo que existe un isómero del asiaticósido no detectado. Así, en el marco de la presente invención, mediante el término “asiaticósido” se entiende la molécula química de fórmula III eventualmente en mezcla con uno de sus isómeros oleánicos, si existe.

30 En el marco de la presente invención, se designará mediante la expresión “mezcla binaria” una mezcla que comprende principalmente madecasósido y terminolósido, no comprendiendo esta mezcla casi ningún asiaticósido, y se designará por la expresión “mezcla ternaria” una mezcla que comprende principalmente madecasósido, terminolósido y asiaticósido.

La presente invención tiene así por objeto un procedimiento de preparación de un extracto que comprende una mezcla de madecasósido, de terminolósido y de asiaticósido, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- 35
- 40
- 45
- extraer las partes aéreas de *Centella asiatica* mediante un disolvente alcohólico;
 - pasar sobre resina aniónica la disolución alcohólica obtenida en la etapa a);
 - deslipidar selectivamente mediante extracción líquido/líquido el eluado obtenido en la etapa b);
 - concentrar la fase hidroalcohólica deslipidada hasta una fase acuosa con filtraciones sucesivas;
 - pasar sucesivamente sobre resina catiónica y después sobre resina aniónica la fase acuosa obtenida en la etapa d);
 - estabilizar la fase acuosa obtenida en la etapa e) mediante la adición de alcohol, y obtener una mezcla que comprende madecasósido, terminolósido y asiaticósido.

50 La presente invención tiene por objetivo un procedimiento de preparación de un extracto que comprende una mezcla de madecasósido y de terminolósido, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- 55
- 60
- 65
- extraer las partes aéreas de *Centella asiatica* mediante un disolvente alcohólico;
 - pasar sobre resina aniónica la disolución alcohólica obtenida en la etapa a);
 - deslipidar selectivamente mediante extracción líquido/líquido el eluado obtenido en la etapa b);
 - concentrar la fase hidroalcohólica deslipidada hasta una fase acuosa con filtraciones sucesivas;
 - pasar sucesivamente sobre resina catiónica y después sobre resina aniónica la fase acuosa obtenida en la etapa d);
 - estabilizar la fase acuosa obtenida en la etapa e) mediante la adición de alcohol,
 - realizar una cromatografía selectiva de la fase hidroalcohólica prepurificada obtenida en la etapa f); y
 - recuperar la mezcla de madecasósido y de terminolósido en su forma final.

ES 2 329 568 T3

La extracción de los principios activos de la planta de *Centella asiatica* se realiza ventajosamente a partir de las partes aéreas de la planta, con el objetivo principal de no deteriorar sus raíces y permitir así la renovación natural de esta planta vivaz.

5 En una variante ventajosa del procedimiento según la invención, las partes aéreas se maceran en un disolvente alcohólico antes de la etapa de extracción. Los disolventes alcohólicos, que se pueden usar según la presente invención, son los usados habitualmente por el experto en la materia, tal como el etanol y en particular el etanol al 70%. La disolución alcohólica así obtenida se purifica después mediante el paso sobre una resina aniónica (etapa b)). La resina aniónica usada en el procedimiento según la invención es ventajosamente una resina aniónica fuerte que posee unos
10 grupos funcionales de tipo amonio cuaternario. Este paso de la disolución alcohólica sobre una resina aniónica permite la captura de las sustancias aniónicas secundarias, en particular de las sustancias fenólicas.

Según una variante ventajosa del procedimiento según la invención, la disolución alcohólica obtenida tras la etapa a) se aclara antes de pasar sobre la resina aniónica. Esta etapa ventajosa de aclarado consiste en añadir a dicha dis-
15 solución alcohólica una disolución de base fuerte, tal como una disolución de hidróxido de sodio, y carbón activado. La adición de bases fuertes permite la precipitación, y así la eliminación por filtración, de los metales y de las demás sustancias presentes susceptibles de reaccionar con estas bases fuertes. La adición de carbón activado permite además descolorar, purificándola, la disolución alcohólica, y fijar unos ácidos grasos o unos productos de oxidación.

20 A continuación de la etapa b) de paso sobre resina, ventajosamente precedida de una etapa de aclarado, el eluado obtenido se purifica de estas fracciones grasas. Para ello, se somete a una extracción líquido/líquido. El disolvente de extracción usado es un disolvente apolar, ventajosamente un alcanos tal como el heptano. Todos los procedimientos de extracción líquido/líquido conocidos por el experto en la materia se pueden usar en el marco del presente proce-
25 dimiento según la invención. En particular, dicha extracción puede ser una centrifugación. Siendo el madecasósido hidrosoluble, se recupera la fase hidroalcohólica.

La fase hidroalcohólica así obtenida se concentra a continuación hasta una fase acuosa y se filtra sucesivamente, ventajosamente varias veces, para permitir la precipitación de los compuestos insolubles en la fase acuosa.

30 A continuación de estas primeras etapas del procedimiento según la invención, se obtiene una fase acuosa en la que los dos heterósidos conocidos de *Centella asiatica*, a saber, el asiaticósido y el madecasósido, así como el terminolósido, son solubles. Esta fase acuosa se purifica a continuación mediante el paso sucesivo sobre una resina catiónica y después sobre una resina aniónica. Esta etapa de paso sucesivo sobre resina catiónica y después sobre
35 resina aniónica es una etapa esencial del procedimiento según la invención. Ventajosamente, la resina catiónica usada es una resina catiónica fuerte que posee unos grupos funcionales de tipo sulfonatos. De manera ventajosa, la resina aniónica usada es una resina aniónica fuerte que posee unos grupos funcionales de tipo amonio cuaternario. En el marco del procedimiento según la invención, el orden de las resinas intercambiadoras de iones es importante con el fin de mejorar la fijación de fracciones ácidas residuales.

40 Según una variante ventajosa de la invención, tras los pasos sucesivos sobre resina catiónica y después aniónica de la etapa e) y antes de la etapa f), la fase acuosa así obtenida pasa asimismo a través de carbón activado. El carbón activado permite así la captación de los compuestos fenólicos secundarios responsables de la coloración de la disolución.

45 Según otra variante ventajosa de la invención, la fase acuosa obtenida tras la etapa e), antes de la etapa f), y eventualmente tras una etapa de paso sobre carbón activado, sufre una o varias etapa(s) de concentración.

La fase acuosa obtenida tras la etapa e), eventualmente después del paso sobre carbón activado y/o decoloración, se estabiliza después mediante la adición de alcohol (etapa f)). Se obtiene entonces una fase hidroalcohólica pre-
50 purificada en la que los dos heterósidos conocidos de *Centella asiatica* y el terminolósido son solubles. La mezcla de madecasósido, terminolósido y asiaticósido se obtiene ventajosamente con una pureza superior al 75% en masa, con relación al peso total de dicha mezcla.

La fase hidroalcohólica prepurificada obtenida en la etapa f) que comprende el madecasósido, el terminolósido y el
55 asiaticósido se puede purificar después mediante cromatografía selectiva. La técnica de cromatografía selectiva es bien conocida por el experto en la materia. Ésta permite separar las moléculas según su afinidad con la fase estacionaria. Esta etapa de cromatografía selectiva permite separar el asiaticósido de la mezcla constituida por el madecasósido y por el terminolósido.

60 En el marco de la presente invención, el eluyente usado durante la cromatografía selectiva es un disolvente polar. Ventajosamente, el disolvente es una mezcla de agua y de etanol en unas proporciones en agua/etanol comprendidas entre 50/50 y 90/10 y típicamente de 75/25 en volumen/volumen.

En el marco de la presente invención, la fase estacionaria usada durante la cromatografía selectiva es una fase
65 estacionaria apolar. Ventajosamente, la fase estacionaria está constituida por sílices apolares injertadas. Los injertos apolares tienen ventajosamente entre 2 y 18 átomos de carbono, y más ventajosamente todavía entre 12 y 18 átomos de carbono.

Tras estas etapas de procedimiento, es decir, en la etapa h), se obtiene una mezcla de madecasósido y de terminolósido. La mezcla tiene ventajosamente una relación másica madecasósido:terminolósido comprendida entre 30 y 70%, más ventajosamente comprendida entre 40 y 60%. Esta mezcla se obtiene ventajosamente con una pureza superior al 95% en masa con relación al peso total de dicha mezcla. Esta mezcla binaria ya no comprende casi ningún asiaticósido (sólo de forma eventual en cantidades del orden de trazas).

La presente invención tiene asimismo por objeto el uso de un extracto de *Centella asiatica* susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento tal como se ha descrito anteriormente y que comprende más de 95% en masa de una mezcla de madecasósido y de terminolósido. Las impurezas presentes son en particular unos ácidos grasos. Según una variante ventajosa, la mezcla de madecasósido y de terminolósido tiene una relación másica en madecasósido con relación al total comprendida entre 30% y 70% en masa de madecasósido, ventajosamente entre 40% y 60% en masa de madecasósido. Ventajosamente, el extracto es un agente anti-inflamatorio e inmunomodulador.

Según otra variante ventajosa de la invención, el procedimiento según la invención puede comprender además una etapa paralela de normalización de la mezcla de madecasósido, de terminolósido y de asiaticósido (mezcla ternaria), obtenida tras la etapa f), mediante la adición de una cantidad apropiada de un extracto muy puro de *Centella asiatica* según la invención, es decir, de una mezcla de madecasósido y de terminolósido que tiene una pureza superior al 95% (mezcla binaria), susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento según la invención tras la etapa h), de manera que el extracto final así obtenido tenga una pureza comprendida entre 90 y 98% en peso, con relación al peso total del extracto final. La mezcla ternaria está así normalizada mediante la adición de la mezcla binaria de manera que se fija el extracto final así obtenido en un intervalo que representa una pureza situada entre 90 y 98% en peso con relación al peso total del extracto final. Por ejemplo, para obtener un extracto final que tiene una pureza de 90%, se mezclará 1 parte de la mezcla binaria con 1 parte de la mezcla ternaria; para tener una pureza final de 98%, se mezclarán 9 partes de la mezcla binaria con 1 parte de la mezcla ternaria.

La presente invención tiene asimismo por objeto el uso de un extracto de *Centella asiatica* normalizado susceptible de ser obtenido tras la etapa de normalización del procedimiento según la invención y que comprende por lo menos 75% en masa, ventajosamente por lo menos 85% en masa, de una mezcla de madecasósido, de terminolósido y de asiaticósido (mezcla terciaria normalizada). Las demás impurezas presentes son en particular unos ácidos grasos. En este extracto normalizado de *Centella asiatica*, la relación másica asiaticósido:(madecasósido+terminolósido) está ventajosamente comprendida entre 5:95 y 25:75. Si el porcentaje másico en asiaticósido es demasiado importante, existe un riesgo de separación de fase. En efecto, el asiaticósido es organosoluble mientras que el madecasósido y el terminolósido son hidrosolubles. La mezcla constituida por madecasósido y por terminolósido es tan hidrosoluble que puede solubilizarse hasta aproximadamente 25% en masa de asiaticósido. En este extracto normalizado de *Centella asiatica*, la relación másica madecasósido:terminolósido está ventajosamente comprendida entre 30:70 y 70:30, todavía más ventajosamente entre 40:60 y 60:40.

La presente invención tiene asimismo por objeto el uso de un medicamento que comprende un extracto de *Centella asiatica* que comprende más de 95% en masa de una mezcla de madecasósido y de terminolósido o un extracto de *Centella asiatica* normalizado tal como se ha descrito anteriormente y un soporte farmacéuticamente aceptable.

El madecasósido y el terminolósido pueden hidrolizarse, en particular en contacto con la flora cutánea, respectivamente en ácido madecásico y en ácido terminólico. Sin embargo, estos ácidos respectivos no muestran ninguna actividad inmunomoduladora.

Cuando un cuerpo extraño, tal como una bacteria o un virus, penetra en nuestro organismo, este último pone en marcha un sistema de defensa, denominado sistema inmunitario, para combatirlo. El sistema inmunitario debe eliminar el cuerpo extraño sin destruir por ello su propio organismo. En una enfermedad autoinmune, el sistema inmunitario ya no reconoce como suyas ciertas estructuras "propias" del organismo, éste se desajusta y es capaz de agredir estas estructuras "propias".

En el caso particular de la psoriasis, los antígenos del organismo, embaucados por la defensa inmunitaria, agreden la piel del sujeto, lo que provoca una deriva inflamatoria. La hiperreacción del sistema regulatorio provoca una hiperproliferación de los queratinocitos y por lo tanto la formación de placas muy gruesas y no homogéneas de queratinocitos y de corneocitos. El medicamento según la invención está destinado a inhibir la producción patológica de las defensas inmunitarias. Dicho medicamento está destinado ventajosamente a regular los mecanismos inflamatorios. De manera todavía más ventajosa, dicho medicamento está destinado al tratamiento de las enfermedades auto-inmunes, de las enfermedades inflamatorias crónicas, de las enfermedades inflamatorias atópicas o de las enfermedades intestinales. Ventajosamente, dicho medicamento está destinado al tratamiento de la psoriasis, del vitíligo, de la pitiriasis, de las esclerodermias, de las dermatosis bullosas, del eczema, de la dermatitis atópica, de la alergia o de la artritis reumatoide.

En el campo de la dermatología, el medicamento según la invención también está destinado a la prevención y al tratamiento de los derivados inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento y sus consecuencias. Dicho medicamento está ventajosamente destinado a la prevención y al tratamiento de las enfermedades seleccionadas de entre las sensibilizaciones anafilácticas, las anomalías pigmentarias de la piel, la hipervascularización dérmica y las fisuras inflamatorias. Dicho medicamento está asimismo destinado ventajosamente a regular la homeostasia tisular

ES 2 329 568 T3

dérmica, a través de una protección y una estimulación celular que tiene por consecuencia la mejora de la matriz extracelular que contribuye al diálogo dermo-epidérmico.

5 El entorno externo agrede permanentemente la piel, ya sea a través de una radiación ultravioleta o a través de una radiación emitida por las lámparas de descarga o los diversos antígenos atmosféricos naturales o existentes debido a la actividad humana, la contaminación urbana, etc., lo que activa unos procesos biológicos de aceleración del envejecimiento natural. El sistema anti-inflamatorio está así en acción de manera permanente, lo que provoca una aceleración de la renovación de los queratinocitos de la piel, incluso una hiperproliferación, que agrava la entropía del tejido por una sobreexpresión de proteínas específicas y a término una pérdida de funcionalidad. La consecuencia resultante es
10 una renovación agotadora de las reservas naturales de células de queratinocitos con el resultado de un envejecimiento prematuro de la piel.

El medicamento se presenta ventajosamente en una forma sólida, pastosa o líquida. Ventajosamente, según la presente invención, el medicamento está formulado para ser administrado por vía tópica, oral, subcutánea, inyectable,
15 rectal y genital. De manera ventajosa, según la presente invención, cuando el medicamento está formulado para ser administrado por vía tópica, dicho medicamento o dicha composición se presentan en forma de disolución acuosa, de crema blanca o teñida, de pomada, de leche, de loción, de gel, de ungüento, de suero, de pasta, de espuma, de aerosol, de champú o de barra. De manera ventajosa, según la presente invención, cuando el medicamento está formulado para ser administrado por vía oral, dicho medicamento puede presentarse en forma de disolución acuosa, de emulsión, de comprimidos, de cápsulas blandas, de cápsulas, de polvos, de gránulos, de disoluciones o también de suspensiones
20 orales. De manera ventajosa, según la presente invención, cuando el medicamento está formulado para ser administrado por vía subcutánea, dicho medicamento puede presentarse en forma de ampollas inyectables estériles. De manera ventajosa según la presente invención, cuando el medicamento está formulado para ser administrado por vía rectal, dicho medicamento o dicha composición pueden presentarse en forma de supositorios. De manera ventajosa, según
25 la presente invención, cuando el medicamento se formula para ser administrado por vía genital, dicho medicamento puede presentarse en forma de óvulos.

La cantidad del medicamento a administrar según la invención depende de la gravedad y de la antigüedad de la afección tratada. Naturalmente, el médico adaptará también la posología en función del enfermo. El tratamiento de
30 pacientes que sufren de una enfermedad autoinmune, mediante el extracto de *Centella asiatica* que contiene más del 95% en masa de la mezcla de madecasósido y de terminolósido con relación al peso total de la mezcla, consiste en particular en la administración tópica de dicho medicamento a razón de 1 a 3% en peso, con relación al volumen del excipiente, de dicho extracto en el vehículo transdérmico, por día en una o más veces. De manera particularmente ventajosa, la administración de dicho medicamento a una dosis tal como se ha definido anteriormente se reparte en 1
35 a 3 administraciones diarias.

40 (Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 329 568 T3

Los ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitar de ninguna manera su alcance.

Ejemplo 1

5 Composición de una crema según la invención

TABLA 1

Ingredientes: INCI	p/p %
Extracto de madecasósido/terminolósido según la invención (pureza > 95%)	1,0%
Beheneth-10	1,5%
Beheneth-25	1,5%
Carbonato de dicaprililo	5,0%
Laurato de hexilo	5,0%
Isohexadecano	5,0%
Isononaoato de cetearilo	5,0%
Dimeticona	1,0%
Alcohol behenílico	2,0%
Glicéridos vegetales hidrogenados	2,0%
Fenoxietanol y parabenos	0,5%
Acetato de tocoferilo	0,5%
Agua desmineralizada	c.s.p. 100
Glicerina	3,0%
Butilenglicol	2,0%
Goma Xantana	0,1%
Carbómero	0,2%

35 Ejemplo 2

Composición de una crema según la invención

TABLA 2

Ingredientes: INCI	p/p %
Extracto de madecasósido/terminolósido según la invención (pureza > 95%)	1%
Glucósido de cetearilo y alcohol cetearílico	0,5%
Triglicérido caprílico/cáprico	0,5%
Escualano	0,5%
Isononanoato de cetearilo	3,0%
Crospolímero de dimeticona	2,0%
Alcohol estearílico	1,5%
Carbonato de dicaprililo	5,0%
Parabenos	0,1%
Agua desmineralizada	c.s.p. 100
Fenoxietanol y Parabenos	0,5%
Glicerina	2,0%
Carbómero	0,3%
PEG 32	2,0%
Goma xantana	0,2%
Octenilsuccinato de almidón aluminico	2,0%

ES 2 329 568 T3

Ejemplo 3

Procedimiento de extracción de una mezcla de madecassósido y de terminolósido puro a más del 95% en masa con relación al peso total del extracto

5

a) Defecación y purificación sobre columna del zumo alcohólico inicial

Las partes aéreas de *Centella asiatica* usadas en este ejemplo comprenden las hojas con aproximadamente 2 a 3 cm de tallo. Se separan 250 kg de partes aéreas de *Centella asiatica* en tres lotes de cantidades iguales. Los principios activos de *Centella asiatica* se extraen de sus partes aéreas según el principio de la extracción a contracorriente. Un lote de partes aéreas de *Centella asiatica* nuevas, es decir, que no ha sufrido aún ninguna maceración ni ninguna filtración y por lo tanto muy rico en principios activos, se extrae una vez con un zumo de segunda extracción, es decir, un disolvente empobrecido y prácticamente saturado en principios activos. El zumo así obtenido, que se denomina zumo final, se envía después directamente a una cuba de defecación. Después, el lote se somete a una segunda extracción con un zumo de primera maceración, es decir, un zumo menos cargado que el zumo usado anteriormente y por lo tanto apropiado para solubilizar más principios activos. Este zumo sirve de zumo de segunda extracción. Por último, el lote se somete a una tercera extracción con un nuevo disolvente y es así apropiado para solubilizar los últimos porcentajes de principios activos todavía presentes en el lote. Este zumo sirve de zumo de primera extracción.

20 En el marco de este ejemplo, el disolvente de maceración y de filtración usado es etanol al 70%. Para 250 kg de partes aéreas de *Centella asiatica* se usan 1.600 l de etanol al 70%.

Según si la etapa anterior de extracción se realiza en una cuba estática o en una cuba dinámica, el tiempo de maceración de las partes aéreas de *Centella asiatica* en el etanol al 70%, más o menos saturado en principios activos, varía de un día a algunas horas. En el caso particular de cubas dinámicas calentadas a una temperatura de 60°C, el tiempo de maceración es de dos horas. Se añaden a continuación al zumo final 10 l de una disolución de hidróxido de sodio al 30% y después 10 kg de carbón activado, que permite mediante agitación descolorar la disolución. La disolución se deja bajo agitación durante 40 minutos y después se filtra. Se pasa el filtrado a través de una resina aniónica fuerte, que posee unos grupos funcionales de tipo amonio cuaternario, a un caudal de 300 l/h.

30

El eluado hidroalcohólico así obtenido se neutraliza después mediante el hidróxido de sodio a un pH aparente comprendido entre 5,3 y 6,9, y después se somete a una extracción líquido/líquido que se centrifuga ventajosamente, mediante heptano.

35 La fase desgrasada así obtenida se concentra por medio de una evaporación continua a presión reducida a una temperatura que no supera los 70°C. Esta concentración permite eliminar el asiaticósido contenido en la fase desgrasada. Se concentra hasta recuperar un volumen de etanol que corresponde a aproximadamente 90% en volumen del volumen inicial de la fase desgrasada y hasta la precipitación en la fase desgrasada del asiaticósido. Después, esta fase se filtra y se recuperan las aguas madre. El madecassósido es tan hidrosoluble que solubiliza aproximadamente 20% en masa del asiaticósido que ha precipitado durante la etapa anterior de concentración.

40

b) Etapas de preparación de una fase hidroalcohólica prepurificada

La fase acuosa concentrada recuperada se purifica al pasar sobre resina catiónica y después sobre resina aniónica. 45 La resina catiónica es una resina catiónica fuerte que posee unos grupos funcionales de tipo sulfonatos. La resina aniónica es una resina aniónica fuerte que posee unos grupos funcionales de tipo amonio cuaternario. El eluado así obtenido es una fase hidroalcohólica que se neutraliza después mediante el ácido clorhídrico a un pH comprendido entre 6,75±0,25, y descolorada mediante el paso sobre carbón activado.

50 La disolución así obtenida se filtra y después se concentra en reactor a presión reducida, hasta obtener una fase acuosa según el mismo principio que la concentración anterior. Después, se reajusta mediante la adición de etanol con el fin de obtener una disolución hidroalcohólica estabilizada que tiene un contenido en materia seca de 200 g ±20 por litro, y un porcentaje de alcohol de 35%±3,5% volumen/volumen. Se obtiene así una fase prepurificada rica en madecassósido y que contiene todavía asiaticósido.

55

c) Etapa de purificación

La fase hidroxi-alcohólica pre-purificada así obtenida se somete después a una separación por cromatografía selectiva. Durante esta cromatografía selectiva, la fase estacionaria usada es una fase constituida por sílices apolares injertadas, teniendo los injertos apolares 18 átomos de carbono y midiendo 10 µm. El disolvente usado es una mezcla de agua al 65% en volumen y de etanol al 35% en volumen con relación al volumen total de la mezcla. El eluado así obtenido se concentra después, se seca y se tritura. Estas diferentes etapas permiten la obtención de un extracto seco de *Centella asiatica*.

65 El extracto seco contiene 99,8% en masa, con relación al peso total del extracto, de una mezcla 51:49 en masa de madecassósido y de terminolósido (mezcla binaria).

ES 2 329 568 T3

Ejemplo 4

Procedimiento de extracción y de preparación de una mezcla estandarizada de madecacosido, terminolósido y asiaticósido

5 El procedimiento de extracción es idéntico al descrito en el ejemplo 3 hasta la etapa de obtención de una fase pre-purificada rica en madecacosido y en terminolósido, y que contiene también asiaticósido (antes de la etapa de purificación):mezcla ternaria.

10 Esta fase pre-purificada tiene una pureza en madecacosido, terminolósido y asiaticósido de 80% en masa. Las impurezas presentes son en particular unos ácidos grasos. Si se restablecen las cantidades de madecacosido, de terminolósido y de asiaticósido al 100%, la mezcla comprende aproximadamente 39% en peso de madecacosido, 39% en peso de terminolósido y 22% en peso de asiaticósido.

15 Este extracto se estandariza mediante la adición de 100% en masa de la mezcla binaria obtenida en el ejemplo 3 (es decir, tanto de mezcla ternaria como de mezcla binaria).

20 Se obtiene entonces un extracto estandarizado de *Centella asiatica* que presenta una pureza de 90% en masa. Este extracto comprende, si se restablecen las cantidades de madecacosido, de terminolósido y de asiaticósido al 100%, 45,7% en peso de madecacosido, 44,5% en peso de terminolósido y 9,8% en peso de asiaticósido.

Ejemplo 5

25 *Aislamiento de dos isómeros madecacosido y terminolósido*

30 Se cromatografían 300 mg de una mezcla de madecacosido y de terminolósido sobre una columna preparadora (de marca Hypurity C18 (250 x 4,6)) que tiene una fase móvil agua:acetonitrilo 81:19 v/v, a 30°C. La detección se efectúa a una longitud de onda de 210 nm. Se obtienen así 95 mg de terminolósido y 85 mg de madecacosido.

La estructura química de madecacosido y de terminolósido se confirma mediante análisis espectrométrico (RMN 1H, RMN 13C y espectrometría de masas).

35 Ejemplo 6

Evaluación de los efectos moduladores de la mezcla de madecacosido y de terminolósido frente al crecimiento celular de queratinocitos humanos hiperproliferativos

40 En este ejemplo, así como en los ejemplos siguientes, el extracto contiene 99,8% de la mezcla de madecacosido y de terminolósido en peso según la invención con relación al peso total del extracto; conteniendo dicha mezcla 51% en peso de madecacosido y 49% en peso de terminolósido, con relación al peso total de la mezcla.

45 Conteniendo el extracto según la invención principalmente la mezcla de madecacosido y de terminolósido, dicho extracto se designará indiferentemente, en este ejemplo así como en los ejemplos siguientes, con la expresión “una mezcla de madecacosido y de terminolósido” o con la expresión “una mezcla según la invención”.

50 El objetivo de este ejemplo es evaluar los efectos moduladores de la mezcla de madecacosido y de terminolósido frente al crecimiento celular de los queratinocitos humanos hiperproliferativos. El ejemplo se ha realizado sobre unos queratinocitos humanos HaCaT estimulados por el queratinocito Growth Factor (denominado en lo sucesivo KGF) y/o la elastasa humana leucocitaria (denominada en lo sucesivo EHL).

a) *Estudio de la citotoxicidad de la mezcla de madecacosido y de terminolósido*

55 Este estudio de citotoxicidad consiste en determinar la dosis máxima de producto que no provoca la toxicidad celular. La citotoxicidad se ha estudiado sobre unos queratinocitos humanos HaCaT inoculados en unas placas de 96 pocillos a razón de 20×10^3 , intervalo amplio, y 10×10^3 , intervalo limitado, células por pocillo. La viabilidad celular se evalúa mediante un ensayo colorimétrico con rojo neutro. El rojo neutro es un colorante poco catiónico que penetra en las membranas celulares mediante un fenómeno de difusión no iónica y que se fija a nivel intracelular sobre los grupos fosfato y/o carboxílico de la matriz lisosomal. Se observan unas modificaciones en la acumulación y la retención del rojo neutro cuando las membranas celulares están dañadas. La densidad óptica de la disolución obtenida después de la incubación de las células en presencia de rojo neutro es por lo tanto proporcional al número de células vivas.

65 Un intervalo amplio de 9 concentraciones, de 0,001 a 1 mg/ml, ha sido ensayado en un primer tiempo. Las diferentes disoluciones-ensayos han sido preparadas en medio DMEM, Dubelco Modified Essential Medium, adicionado con 10% en volumen de SVF, suero de ternera fetal. Después de 24 horas de contacto, las concentraciones inferiores o iguales a 1 mg/ml no inducen ninguna modificación significativa de la respuesta celular frente al rojo neutro. Una

ES 2 329 568 T3

disminución muy pequeña de la captura del rojo neutro, que corresponde a 10% de inhibición, se observa únicamente con la concentración más fuerte ensayada de 1 mg/ml. A partir de estos resultados, se ha establecido un intervalo limitado, entre 0,05 y 5 mg/ml, con el fin de precisar la dosis máxima no citotóxica. La viabilidad celular se evalúa mediante un ensayo colorimétrico con rojo neutro, después de 72 horas de incubación. Los resultados confirman la no toxicidad de las concentraciones inferiores o iguales a 1 mg/ml. A partir de 1 mg/ml, se observa un ligero efecto citotóxico dependiente de la dosis. La concentración más alta ensayada, 5 mg/ml, inhibe en un 43% la respuesta celular frente al rojo neutro.

Se ha ensayado un segundo intervalo limitado comprendido entre 0,075 y 5 mg/ml. El ensayo se ha realizado sobre unas células HaCaT, después de la solubilización de la mezcla de madecasósido y de terminolósido en dimetilsulfóxido, denominado a continuación DMSO, a una concentración de 1%. La viabilidad celular se evalúa mediante un ensayo colorimétrico con rojo neutro, después de 72 horas de incubación. Los resultados obtenidos son similares a los registrados en ausencia de DMSO.

La tabla 3 siguiente agrupa el conjunto de los resultados, y la viabilidad celular se expresa en porcentaje del ensayo de control.

TABLA 3

Concentración (mg/ml)	0,05	0,075	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5
Intervalo amplio (24h)	102%	n.t.	105%	n.t.	100%	n.t.	90%	n.t.	n.t.
Intervalo limitado nº 1 (72h)	99%	100%	98%	99%	97%	96%	91%	80%	57%
Intervalo limitado nº 2 (72h)	n.t.	102%	101%	99%	97%	94%	91%	78%	55%

La abreviatura n.t. significa no ensayado.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió considerar la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$, como dosis máxima, para ensayar la actividad anti-proliferación de la mezcla de madecasósido y de terminolósido.

b) Efecto sobre la proliferación celular

El principio del ensayo se basa en la evaluación del crecimiento de queratinocitos humanos hiperproliferativos en ausencia y en presencia de la mezcla de madecasósido y de terminolósido. El método de basa en la medición de las densidades celulares a nivel de los cultivos estimulados por el KGF o por la EHL. Las densidades celulares se aprecian mediante un ensayo colorimétrico con rojo neutro. La absorbancia de las disoluciones se lee a 540 nm con la ayuda de un lector de microplaca.

Se han ensayado 4 concentraciones de la mezcla de madecasósido y de terminolósido:

$$C_1 = 10 \mu\text{g/ml} \quad C_2 = 30 \mu\text{g/ml} \quad C_3 = 100 \mu\text{g/ml} \quad C_4 = 300 \mu\text{g/ml}$$

b.1) Estimulación mediante KGF

Se preparan 6 lotes de ensayo: un lote de control (células no estimuladas), un lote de control KGF (células estimuladas mediante KGF a una concentración de 100 ng/ml) y 4 lotes tratados (células estimuladas mediante KGF y tratadas con la mezcla de madecasósido y de terminolósido). Se miden las densidades ópticas a t=0 días, t=2 días y t=5 días. Las medias de las densidades ópticas, D.O., se convierten en densidades celulares, células/pocillo, a partir de la recta de regresión: $D.O.=0,00355 \times (10^3 \text{ células/pocillo}) + 0,0018$.

ES 2 329 568 T3

La tabla 4 siguiente agrupa las densidades celulares observadas al cabo de 2 y 5 días después de la activación de las células por el KGF.

TABLA 4

Estimulación KGF	Tratamiento 2 días		Tratamiento 5 días	
	Células/pocillo	Crecimiento celular	Células/pocillo	Crecimiento celular
Control sin KGF	56465±2486		115802±988	
Control con KGF	85833±1742	100%	157616±6359	100%
C ₁ y KGF	84388±2616	98% n.s.	161354±5165	102% n.s.
C ₂ y KGF	85304±1312	99% n.s.	161248±4232	102% n.s.
C ₃ y KGF	84317±1444	98% n.s.	152081±2536	96% n.s.
C ₄ y KGF	83259±1960	97% n.s.	150071±7087	95% n.s.

La abreviatura n.s. significa que el resultado no es estadísticamente significativo.

Los resultados obtenidos no muestran ninguna modificación significativa del crecimiento de las células HaCaT estimuladas por el KGF, después de 2 ó 5 días de cultivo en presencia de la mezcla según la invención.

b.2) Estimulación mediante EHL

Se preparan 6 lotes de ensayo: un lote de control (células no estimuladas), un lote de control KGF (células estimuladas por EHL a una concentración de 3 nM, es decir, 90 ng/ml) y 4 lotes tratados (células estimuladas por EHL y tratadas con la mezcla de madecacosido y de terminolósido). Se miden las densidades ópticas a t=0 días, t=2 días y t=5 días. Las medias de las densidades ópticas, D.O., se convierten en densidades celulares, célula/pocillo, a partir de la recta de regresión: D.O. = 0,00458 x (10³ células/pocillo) + 0,041.

La tabla 5 siguiente agrupa las densidades celulares registradas al cabo de 2 y 5 días después de la activación de las células por EHL.

TABLA 5

Estimulación EHL	Tratamiento 2 días		Tratamiento 5 días	
	Células/pocillo	Crecimiento celular	Células/pocillo	Crecimiento celular
Control sin EHL	66668±1380		89180±2202	
Control con EHL	875973±1400	100%	157616±6359	100%
C ₁ y EHL	76764±799	101% n.s.	114584±2463	100% n.s.
C ₂ y EHL	75891±1190	100% n.s.	115539±1261	101% n.s.
C ₃ y EHL	73408±1690	97% (p ≤ 0,05)	112428±1548	98% (p ≤ 0,05)
C ₄ y EHL	72016±1597	95% (p ≤ 0,05).	93355±1429	82% (p ≤ 0,05)

La abreviatura n.s. significa que el resultado no es estadísticamente significativo.

p ≤ 0,05 significa que los resultados son estadísticamente significativos, con un error de 0,05%.

Los resultados obtenidos muestran una ligera disminución del crecimiento de las células HaCaT estimuladas por EHL, después de 2 ó 5 días de cultivo en presencia de la mezcla según la invención. Este ligero efecto inhibitor aparece sólo a las concentraciones altas. A 300 µg/ml, la mezcla de madecacosido y de terminolósido reduce en un 18% con relación al control el crecimiento de las células activadas por EHL después de 5 días de tratamiento.

c) *Conclusión*

En conclusión, el KGF, a una concentración de 100 ng/ml, y la EHL, a una concentración de 90 ng/ml, estimulan el crecimiento de las células HaCaT.

La mezcla de madecacosido y de terminolósido no es capaz, en el intervalo de las concentraciones ensayadas, de modular el crecimiento de las células HaCaT estimuladas por KGF. La mezcla según la invención es capaz de modular, de manera dependiente de la dosis, el crecimiento de las células HaCaT estimuladas por EHL. La mezcla de madecacosido y de terminolósido a la dosis de 300 µg/ml es capaz de reducir en un 18% el crecimiento de las células HaCaT estimuladas por EHL.

Ejemplo 7

Demostración de la actividad anti-inflamatoria de la mezcla de madecacosido y de terminolósido sobre unos queratinocitos humanos en cultivo

El objetivo de este ejemplo es evaluar la actividad anti-inflamatoria de la mezcla según la invención sobre la producción y la liberación de citoquinas epidérmicas pro-inflamatorias; IL-1α y PGE-2, por unos queratinocitos humanos en cultivo, sometidos a un estrés irritativo.

a) *Estudio de la citotoxicidad de la mezcla de madecacosido y de terminolósido*

Este estudio de citotoxicidad ha sido llevado a cabo de la misma manera que en el ejemplo 4, y se han obtenido los mismos resultados. Además, el estudio de citotoxicidad ha sido completado por un ensayo sobre queratinocitos humanos, cepa K₀₂₋₁H₄, con el fin de confirmar la no-toxicidad de las concentraciones sobre las células dianas.

Se ha estudiado una gama de 8 concentraciones, de 0,075 a 5 mg/ml. La mezcla de madecacosido y de terminolósido previamente solubilizada en DMSO se ha añadido al medio de cultivo a las concentraciones elegidas, y la concentración final de DMSO es de 1%. La viabilidad celular se ha efectuado mediante un ensayo de rojo neutro.

Los resultados confirman la no toxicidad de las concentraciones inferiores o iguales a 2,5 mg/ml, después de 72 horas de incubación. La concentración más fuerte ensayada, de 5 mg/ml, provoca una inhibición de 30% de la captura del rojo neutro.

La tabla 6 siguiente agrupa los resultados. La viabilidad celular se expresa en porcentaje del ensayo de control.

TABLA 6

Concentración (mg/ml)	0,075	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5
Viabilidad (72h)	98%	96%	102%	96%	93%	98%	95%	70%

Teniendo en cuenta estos resultados, se ha decidido considerar la concentración de 1 mg/ml como dosis máxima para ensayar la actividad anti-inflamatoria de la mezcla de madecacosido y de terminolósido.

b) *Actividad anti-inflamatoria*

El principio del ensayo se basa en la valuación de la producción de citoquinas pro-inflamatorias por unos queratinocitos humanos, en respuesta a un estrés irritativo. El método se basa en la medición del porcentaje intracelular de IL-1α y del porcentaje de PGE-2 liberado en el medio extracelular por unos queratinocitos cultivados en ausencia y en presencia de la mezcla de madecacosido y de terminolósido y estimulado por PMA, es decir, el 13-acetato de forbol-1,2-miristato.

El estudio se ha realizado sobre unos queratinocitos aislados a partir de piel de prepucio de niños jóvenes, cepa K₀₂₋₁H₄. Se han ensayado 3 concentraciones de la mezcla de madecacosido y de terminolósido:

$$C_1 = 0,1 \text{ mg/ml} \quad C_2 = 0,5 \text{ mg/ml} \quad C_3 = 1,0 \text{ mg/ml}$$

b.1) *Liberación de PGE-2*

La tabla 7 siguiente agrupa los porcentajes de PGE-2, expresados en pg/µg de proteína, obtenido después de la activación de las células así como los porcentajes basales. La producción de PGE-2 inducida por el PMA y la actividad anti-inflamatoria (a continuación denominada AAI) se han calculado para cada concentración según:

ES 2 329 568 T3

$$\text{PGE-2 producción} = \text{PGE-2}_{\text{con PMA}} - \text{PGE-2}_{\text{sin PMA}}, \text{ y}$$

$$\text{AAI} = \left[\frac{(\text{PGE-2 producción}_{\text{células de control}} - \text{PGE-2 producción}_{\text{células tratadas}})}{\text{PGE-2 producción}_{\text{células de control}}} \right] \times 100$$

TABLA 7

Mezcla de madecasoído y de terminoloído	0 mg/ml cultivos de control	0,1 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
PGE-2 sin PMA	4,96±0,52	4,96±0,52	4,96±0,52	4,96±0,52
PGE-2 con PMA	39,34±2,64	18,73±0,67	10,69±0,50	6,60±0,44
PGE-2 producción	34,38±2,64	13,77±0,67	5,73±0,50	1,64±0,44
Actividad anti-inflamatoria (%)		60%	83%	95%

La exposición de los queratinocitos al PMA se traduce por una producción y una liberación muy importantes de PGE-2 en los medios de cultivo de los cultivos de control. En efecto, el porcentaje de base registrado a nivel de los cultivos no estimulados se multiplica por 8 después de la estimulación por el PMA. Estos resultados confirman que PGE-2 es una citoquina cuya expresión, producción y liberación pueden ser inducidas por un agente inflamatorio tal como el PMA.

Los porcentajes de PGE-2 registrados después de la estimulación por el PMA a nivel de los cultivos tratados con la mezcla de madecasoído y de terminoloído son claramente inferiores a los observados a nivel de los cultivos de control. Este efecto inhibidor de la mezcla según la invención frente a la producción de PGE-2 inducida por el PMA es dependiente de la dosis. Las diferencias registradas a nivel de los lotes C₁, C₂ y C₃ han resultado estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$, ensayo t de Student). La concentración más alta de la mezcla de madecasoído y de terminoloído ensayada, de 1 mg/ml, es capaz de inhibir totalmente la producción de PGE-2 inducida por el PMA.

b.2) Producción de IL-1 α intracelular

La tabla 8 siguiente agrupa los porcentajes intracelulares de IL-1 α , expresados en pg/ μ g, obtenida después de la activación de las células así como los porcentajes basales. La producción de IL-1 α inducida por PMA y la actividad anti-inflamatoria (a continuación denominada AAI) han sido calculados para cada concentración según:

$$\text{IL-1}\alpha \text{ producción} = \text{IL-1}\alpha_{\text{con PMA}} - \text{IL-1}\alpha_{\text{sin PMA}}, \text{ y}$$

$$\text{AAI} = \left[\frac{(\text{IL-1}\alpha \text{ producción}_{\text{células de control}} - \text{IL-1}\alpha \text{ producción}_{\text{células tratadas}})}{\text{IL-1}\alpha \text{ producción}_{\text{células de control}}} \right] \times 100$$

TABLA 8

Mezcla de madecasoído y de terminoloído	0 mg/ml cultivos de control	0,1 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
IL-1 α sin PMA	2,88±0,23	2,88±0,23	2,88±0,23	2,88±0,23
IL-1 α con PMA	12,11±0,41	8,94±0,11	6,86±0,47	4,70±0,30
IL-1 α producción	9,23±0,41	6,06±0,11	3,98±0,47	1,82±0,30
Actividad anti-inflamatoria (%)		34%	57%	80%

La exposición de los queratinocitos al PMA se traduce por una producción y una liberación muy importantes de IL-1 α en los medios de cultivo de los cultivos de control. En efecto, el porcentaje de base registrado a nivel de los cultivos no estimulados se multiplica por 4 después de la estimulación por el PMA. Estos resultados confirman que IL-1 α es una citoquina cuya expresión, producción y liberación pueden ser inducidas por un agente inflamatorio tal como el PMA.

ES 2 329 568 T3

Los porcentajes de IL-1 α observados después de la estimulación por PMA a nivel de los cultivos tratados con la mezcla de madecacosido y de terminolósido son claramente inferiores a los observados a nivel de los cultivos de control. Este efecto inhibitor de la mezcla según la invención frente a la producción y a la acumulación de IL-1 α inducida por el PMA es dependiente de la dosis. Las diferencias registradas a nivel de los lotes C₁, C₂ y C₃ han resultado estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$, ensayo t de Student). La concentración más alta de la mezcla de madecacosido y de terminolósido ensayada, de 1 mg/ml, es capaz de reducir en un 80% la producción de IL-1 α inducida por el PMA.

c) Conclusión

La actividad anti-inflamatoria de la mezcla de madecacosido y de terminolósido ha sido evaluada sobre un modelo *in vitro* por su capacidad para modular la producción de dos citoquinas epidérmicas, PGE-2 e IL-1 α , que desempeñan una función clave en las etapas del proceso inflamatorio. El estudio se ha realizado sobre unos cultivos de queratinocitos humanos normales estimulados por un agente irritante, el PMA. Este ejemplo muestra que PMA, a una dosis no tóxica de 10 ng/ml, induce por un lado, un aumento muy claro del porcentaje de IL-1 α intracelular y provoca, por otro lado, la producción y la liberación de PGE-2 en los medios de cultivo.

La mezcla de madecacosido y de terminolósido es capaz de reducir muy claramente la liberación del PGE-2 inducido por PMA. La mezcla a la dosis de 1 mg/ml es capaz de inhibir totalmente la liberación de PGE-2. La mezcla según la invención es capaz de modular, de manera dependiente de la dosis, la producción y la acumulación intracelular de IL-1 α inducida por el PMA.

Teniendo en cuenta la función importante de estas dos citoquinas en el proceso inflamatorio, la capacidad manifestada por la mezcla de madecacosido y de terminolósido para modular, de manera dependiente de la dosis, la expresión y la liberación de PGE-2, así como la producción de IL-1 α por unos queratinocitos estimulados *in vitro*, se puede considerar como una actividad anti-inflamatoria.

Ejemplo 8

Evaluación de la actividad anti-inflamatoria de la mezcla de madecacosido y de terminolósido sobre unos queratinocitos humanos en cultivo

El objetivo de este ejemplo es evaluar la actividad anti-inflamatoria de la mezcla de madecacosido y de terminolósido sobre la producción de TNF- α y de IL-8 inducida por el interferón γ .

a) Estudio de citotoxicidad

Este estudio de citotoxicidad se ha llevado a cabo de la misma manera que en el ejemplo 4 y se han obtenido los mismos resultados.

Teniendo en cuenta estos resultados, se ha decidido considerar la concentración de 1 mg/ml como dosis máxima para ensayar la actividad anti-inflamatoria de la mezcla de madecacosido y de terminolósido.

b) Efecto del interferón γ sobre la producción de citoquinas epidérmicas

El estudio se realiza sobre unos queratinocitos humanos normales. Las células se tratan en primer lugar con 4 concentraciones de interferón-gamma (IFN- γ), durante 24 horas.

A continuación, se miden los mediadores de la inflamación a nivel de los cultivos de control y tratados por IFN- γ mediante una dosificación de IL-8 y de TNF- α en los sobrenadantes de cultivo, y mediante una dosificación de las proteínas celulares. El procedimiento de medición utilizado es el procedimiento con azul de Coomassie; se trata de un procedimiento estándar. Los resultados se proporcionan en las tablas 9 y 10 siguientes:

TABLA 9

IL-8 (pg/ μ g proteínas)	Control			Interferón- γ (U/ml)	
	0	100	500	1.000	2.000
Media	0,077	0,980	1,301	1,991	2,917
Desviación estándar	0,060	0,119	0,102	0,113	0,138

ES 2 329 568 T3

TABLA 10

TNF- α (pg/ μ g proteínas)	Control	Interferón- γ (U/ml)			
		0	100	500	1.000
Media	3,260	3,198	8,605	10,773	14,545
Desviación estándar	0,519	0,744	1,195	1,673	1,256

Los resultados obtenidos muestran que el interferón- γ , en la gama de las concentraciones ensayadas, de 100 a 2.000 U/ml, induce, de manera dependiente de la dosis, una clara estimulación de la producción de TNF- α y de IL-8. La letra U es la abreviatura de unidad; 1 U corresponde una unidad de interferón- γ .

En el caso de la citoquina epidérmica TNF- α , el porcentaje de base registrado a nivel de los cultivos no estimulados se multiplica respectivamente por 3,3 y por 4,5 después de la estimulación mediante el interferón a 1.000 y 2.000 U/ml. En el caso de la citoquina epidérmica IL-8, el porcentaje de base registrado a nivel de los cultivos no estimulados se multiplica respectivamente por 26 y por 38 después de la estimulación por el interferón a 1.000 y 2.000 U/ml.

Estos resultados confirman que el interferón es capaz de estimular la expresión, la producción y la liberación de estas dos citoquinas epidérmicas. A la vista de estos resultados, se ha decidido considerar la concentración de 1.000 U/ml para estimular los queratinocitos.

c) Actividad anti-inflamatoria de la mezcla de madecacosido y de terminolósido

El estudio se realiza sobre unos queratinocitos humanos normales. Las células se tratan en primer lugar durante 48 h con el producto en estudio antes de la inducción del estrés irritativo. Después, se induce un estrés irritante mediante la adición de una disolución de interferón- γ , IFN- γ . Las células así activadas se incuban durante 24 h en presencia del producto en estudio. Por último, se dosifican los porcentajes de IL-8 y de TNF- α en los sobrenadantes de cultivo y se dosifican asimismo las proteínas celulares.

c.1) Resultados sobre la citoquina IL-8

Las siguientes tablas agrupan los porcentajes de IL-8, expresados en pg/ μ g de proteína, obtenidos después de la activación de las células así como el porcentaje basal. La actividad anti-inflamatoria (AAI) se ha calculado para cada concentración según la fórmula:

$$A.A.I. = [(IL-8_{(células\ de\ control\ +\ IFN)} - IL-8_{(células\ tratadas\ +\ IFN)}) / IL-8_{(células\ de\ control\ +\ IFN)}] \times 100$$

Los resultados de las muestras de queratinocitos tratados con la mezcla de madecacosido y de terminolósido se proporcionan en la tabla 11 siguiente:

TABLA 11

IL-8 (pg/ μ g prot.)	Control sin IFN	Control con IFN	IFN y mezcla madecacosido + terminolósido			
		0,06 \pm 0,01	1,03 \pm 0,04	0,72 \pm 0,09	0,53 \pm 0,06	0,39 \pm 0,03
Actividad anti-inflamatoria			31%	49%	62%	63%

Los resultados obtenidos muestran una producción y una liberación muy importantes de IL-8 en los medios de los cultivos de control después de la estimulación por el interferón- γ , a una concentración de 100 U/ml. El porcentaje de base registrado a nivel de los cultivos no estimulados se multiplica por 18 después de la estimulación por el IFN- γ . Por otro lado, estos resultados muestran asimismo una disminución muy importante, dependiente de la dosis, del porcentaje de IL-8 a nivel de los cultivos tratados estimulados por IFN- γ . La producción de IL-8 inducida por el interferón es muy claramente inferior a la observada a nivel de los cultivos del lote de control. La concentración más alta de la mezcla de madecacosido y de terminolósido es capaz de inhibir en un 63% la liberación de IL-8 inducida por IFN- γ . Las diferencias observadas a nivel de los lotes C1, C2, C3 y C4 han resultado estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$, ensayo t de Student) con relación al lote de control.

ES 2 329 568 T3

c.2) Resultados sobre la citoquina TNF- α

Las tablas siguientes agrupan los porcentajes de TNF- α (pg/mg proteínas) obtenidos después de la activación de las células, así como el porcentaje basal. La actividad anti-inflamatoria (AAI) ha sido calculada para cada concentración según la fórmula:

$$A.A.I. = [(TNF-\alpha_{(células\ de\ control\ +\ IFN)} - TNF-\alpha_{(células\ tratadas\ +\ IFN)}) / TNF-\alpha_{(células\ de\ control\ +\ IFN)}] \times 100$$

Los resultados de las muestras de queratinocitos tratados con la mezcla de madecacosido y de terminolósido se proporcionan en la tabla 12 siguiente:

TABLA 12

	Control sin IFN	Control con IFN	IFN y mezcla madecacosido + terminolósido			
			0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
TNF- α (pg/ μ g prot.)	2,39 \pm 0,16	5,26 \pm 0,31	4,95 \pm 0,22	4,97 \pm 0,24	4,67 \pm 0,15	3,92 \pm 0,10
Actividad anti-inflamatoria			6%	6%	11%	26%

Los resultados obtenidos muestran una producción y una liberación importantes de TNF- α en los medios de los cultivos de control después de la estimulación por el interferón- γ , a una concentración de 100 U/ml. El porcentaje de base registrado a nivel de los cultivos no estimulados se multiplica por 2,2 después de la estimulación por IFN- γ , a una concentración de 1.000 U/ml. Los resultados obtenidos muestran asimismo una ligera disminución, dependiente de la dosis, del porcentaje de TNF- α a nivel de los cultivos tratados estimulados por IFN- γ . La concentración más alta de la mezcla de madecacosido y de terminolósido es capaz de inhibir en un 26% la liberación de TNF- α inducida por el IFN- γ .

c) Conclusión

La actividad anti-inflamatoria de la mezcla de madecacosido y de terminolósido ha sido evaluada sobre un modelo *in vitro* por su capacidad para modular la producción de dos citoquinas epidérmicas, IL-8 y TNF- α , que desempeñan una función clave en las etapas del proceso inflamatorio. El estudio se ha realizado sobre unos cultivos de queratinocitos humanos normales estimulados por un agente irritante, el IFN- γ .

Este ejemplo muestra que IFN- γ a una dosis no tóxica de 1.000 U/ml, induce por un lado, un aumento muy claro del porcentaje de IL-8 y provoca, por otro lado, la producción y la liberación de TNF- α en los medios de cultivo. La mezcla según la invención es capaz de modular, de manera dependiente de la dosis, la producción y la acumulación intracelular de IL-8 inducida por IFN- γ . La mezcla a la dosis de 1 mg/ml es capaz de inhibir en un 63% la liberación de IL-8.

La mezcla de madecacosido y de terminolósido es capaz de reducir la liberación de TNF- α inducida por el IFN- γ . La mezcla a la dosis de 1 mg/ml es capaz de inhibir en un 26% la liberación de TNF- α .

Si se debieran extrapolar los resultados obtenidos en un sistema cerrado, es decir, los ensayos efectuados *in vitro*, a unas hipótesis de mecanismo de actividades clínicas efectivas, *in vivo*, se podrían objetivar las observaciones siguientes: El TNF- α es uno de los activadores de la producción de IL-8, no sólo a nivel queratinocitario, sino también y sobre todo a niveles macrofágicos y linfocitarios B.

El hecho de que la mezcla, por un lado, disminuye sólo parcialmente la expresión del TNF- α es, más allá de la moderación de la expresión de señales inflamatorias, la manifestación de un control de la actividad de un sistema inmunitario no deprimido puesto que TNF- α desempeña una función importante en el control y la vigilancia celulares de la piel, en particular de la fase apoptótica. Por otro lado, esta mezcla disminuye la expresión de IL-8 con, como consecuencia, una atenuación del quimiotactismo de los polinucleares neutrófilos y basófilos, y las consecuencias sobre la disminución de la "presión" proteolítica con, como secuencia, la moderación de la propagación de la señal inflamatoria, y además, la disminución de la permeabilidad vascular. Otra consecuencia es la menor activación, en cambio, de los linfocitos T de la piel por IL-8.

ES 2 329 568 T3

Ejemplo 9

Efecto de la mezcla de madecassósido y de terminolósido frente a la producción de SKALP por unos queratinocitos humanos

5 El objetivo de este ejemplo es evaluar la actividad anti-psoriasis de la mezcla de madecassósido y de terminolósido sobre la expresión de la citoqueratina 10, particularmente de la elafina, a continuación abreviada CK10 o SKALP, por unos queratinocitos en estado de diferenciación.

10 a) Estudio de citotoxicidad

Este estudio de citotoxicidad se ha llevado a cabo de la misma manera que en el ejemplo 4, y se han obtenido los mismos resultados. Teniendo en cuenta estos resultados, se ha decidido considerar la concentración de 1 mg/ml como dosis máxima para ensayar la actividad anti-psoriasis de la mezcla de madecassósido y de terminolósido.

15 b) Expresión de SKALP y diferenciación de los queratinocitos

El estudio se realiza sobre unos queratinocitos humanos normales. Las células se cultivan en tres medios diferentes:

- 20 - Medio de “proliferación”: medio KGM con gf, growth factor o factor de crecimiento, medio suplementado con factores de crecimiento
- Medio de “diferenciación normal”: medio KGM sin gf, medio reducido en factores de crecimiento
- 25 - Medio de “diferenciación tipo psoriasis”: medio KGM con SVF, medio suplementado con suero de ternera fetal, denominado en lo sucesivo SVF (5%).

30 A continuación, se mide el porcentaje de SKALP en los medios de incubación de las células cultivadas durante 72 h en estos diferentes medios. El ensayo de medición es el ensayo ELISA descrito en Skin pharmacology and applied skin physiology, 2002; 15: 152-261.

Los resultados son los siguientes:

35 1. Medio KGM con gf	SKALP = 1,17±0,18 ng/μg proteínas	100
2. Medio KGM sin gf	SKALP = 1,34±0,20 ng/μg proteínas	115
3. Medio KGM con FCS	SKALP = 2,76±0,08 ng/μg proteínas	236

40 Los resultados obtenidos muestran que la expresión de SKALP varía en función del estado de diferenciación de las células. La producción de SKALP aumenta muy claramente cuando las células se cultivan en un medio que contiene SVF. El porcentaje de SKALP en medio de diferenciación “tipo psoriasis” se multiplica por 2,4 con relación al porcentaje de SKALP observado en medio de proliferación.

45 c) Efecto “anti-psoriasis” de los productos estudiados

Las condiciones de ensayo son las siguientes: se cultivan unas células en medio de diferenciación “normal”, es decir, en medio KGM sin gf, y en medio de diferenciación “tipo psoriasis”; es decir, en medio KGM con SVF, en ausencia, lo que corresponde al lote de control, y en presencia de la mezcla según la invención, durante 72 h. Se dosifica a continuación el porcentaje de SKALP en los sobrenadantes de cultivo. Se dosifican asimismo las proteínas celulares. Las tablas 13 y 14 siguientes agrupan los porcentajes de SKALP, expresados en ng/μg proteínas, obtenidos después del cultivo de las células en medio KGM sin gf y en medio KGM con FCS.

55 α) Cultivo en medio de diferenciación “normal”: Medio KGM sin gf

TABLA 13

	KGM con gf	KGM sin gf	KGM sin gf + mezcla según la invención			
			0 mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml
60 SKALP (ng/μg prot.)	1,17±0,18	1,34±0,20	1,01±0,24	1,15±0,16	1,05±0,18	0,53±0,14
65 SKALP PRODUCCIÓN		100%	75%	86%	78%	40%

ES 2 329 568 T3

Los resultados obtenidos muestran una disminución del porcentaje de SKALP a nivel de los cultivos tratados con la mezcla según la invención. Sólo la diferencia registrada a nivel del lote C4 ha resultado estadísticamente significativa ($p \leq 0,01$, ensayo t de Student) con relación al control “KGM sin gf”. La concentración más alta de la mezcla de madecassósido y de terminolósido es capaz de inhibir en un 60% la secreción de SKALP en medio de diferenciación “normal”.

β) Cultivo en medio de diferenciación “tipo psoriasis”: medio KGM con FCS

TABLA 14

	KGM con gf	KGM con FCS	KGM con FCS + mezcla según la invención			
			0 mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml
SKALP (ng/μg prot.)	1,13±0,19	2,76±0,08	2,22±0,24	2,34±0,12	2,06±0,15	1,64±0,10
SKALP PRODUCCIÓN		100%	80%	85%	75%	60%

Los resultados obtenidos muestran una disminución dependiente de la dosis del porcentaje de SKALP a nivel de los cultivos tratados con la mezcla según la invención. Las diferencias registradas a nivel de los lotes C1, C2, C3 y C4 han resultado estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$, ensayo t de Student) con relación al control “KGM con FCS”. La concentración más alta de la mezcla de madecassósido y de terminolósido es capaz de inhibir en un 40% la secreción de SKALP en medio de diferenciación “tipo psoriasis”.

d) *Conclusión*

La actividad anti-psoriasis de la mezcla de madecassósido y de terminolósido se ha evaluado sobre un modelo *in vitro* por su capacidad para modular la secreción de SKALP, que desempeñaría una función clave en las enfermedades del tipo psoriasis. El estudio se ha realizado sobre unos cultivos de queratinocitos humanos normales en diferentes medios.

Este ejemplo muestra que la expresión de SKALP varía en función del estado de diferenciación de las células y aumenta muy claramente en un medio “tipo psoriasis”, es decir, que contiene FCS.

La mezcla según la invención es capaz de inhibir, de manera dependiente de la dosis, la secreción de SKALP en un medio de diferenciación “normal” y en un medio de diferenciación “tipo psoriasis”. La mezcla a la dosis de 1 mg/ml es capaz de inhibir en un 60% la secreción de SKALP en un medio de diferenciación “normal” y en un 40% la secreción de SKALP en un medio de diferenciación “tipo psoriasis”. Teniendo en cuenta la función importante de la secreción de SKALP en la psoriasis, la capacidad manifestada por la mezcla de madecassósido y de terminolósido para modular, de manera dependiente de la dosis, la secreción de SKALP por unos queratinocitos en diferentes medios de diferenciación *in vitro*, se puede considerar como una actividad anti-psoriasis. Este resultado demuestra el efecto protector de la mezcla según la invención frente a unas células epidérmicas en el contexto proteolítico que caracteriza un modelo de tipo psoriasis, según un modo de desensibilización celular en el contexto de la reacción hiperplásica inflamatoria.

Ejemplo 10

Efectos de la mezcla de madecassósido y de terminolósido sobre la activación de NF-κB en unos cultivos de fibroblastos

El “Nuclear factor κB” es un factor de transcripción que dirige la expresión de los genes que codifican las citoquinas, las quimioquinas, los factores de crecimiento, las moléculas de adhesión celular y ciertas proteínas de fase breve. NFκB está activado por varios agentes, incluyendo las citoquinas, los radicales libres, las partículas inhaladas, la irradiación ultravioleta, y unas bacterias o unos virus.

Los agentes inflamatorios tales como el TNF-α inducen la transcripción de genes pro-inflamatorios-diana a través de la activación, entre otros, del factor de transcripción NFκB. En condiciones no estimuladas, el factor de transcripción NFκB está unido en el citoplasma a una proteína inhibidora IκB. La unión de TNF-α a su receptor conduce a la fosforilación de este complejo y a la disociación de NFκB del inhibidor. NFκB activado migra entonces en el núcleo y se fija sobre una secuencia promotora, denominada secuencia de consenso NFκB, específica de los genes transactivados por NFκB. Esta secuencia conduce a la transcripción de los genes diana. Por lo tanto, la activación de NFκB se puede medir poniendo en contacto unos extractos nucleares estimulados o no con unas secuencias oligonucleotídicas de consenso NFκB inmovilizadas sobre unos soportes y cuantificando NFκB unido con la ayuda de un método inmunoenzimático, tal como ELISA con un anticuerpo anti-NFκB.

ES 2 329 568 T3

Este estudio permite evaluar los efectos de la mezcla según la invención sobre la activación de NFκB usando un método específico muy sensible basado en la medición de la unión del factor de transcripción NFκB a la secuencia oligonucleotídica de consenso inmovilizada sobre un soporte plástico. NFκB unido es reconocido secundariamente por un anticuerpo específico anti-NFκB.

Este ensayo se ha realizado sobre unos núcleos aislados de fibroblastos humanos normales.

El medio de cultivo es el DMEM que comprende:

- L-glutamina 2 mM
- penicilina 50 UI/ml estreptomicina 50 μg/ml
- suero de ternera fetal al 10% (v/v) para el pre-cultivo y después paso a un medio sin suero

TABLA 15

Producto ensayado	Disolución stock	Dilución	Concentración final ensayada
Mezcla según la invención	10% en medio de cultivo	Medio de cultivo	0,01%

TABLA 16

Referencias	Disolución stock	Dilución	Concentración final ensayada
Dexametasona (Sigma D1756)	10 ⁻² en DMSO	Medio de cultivo	0,1 μM
Sulfasalazina (Sigma S0883, PM 398,4)	1 M en DMSO	Medio de cultivo	5 mM

a) Estudio de la citotoxicidad de la mezcla de madecassósido y de terminolósido

Este estudio de citotoxicidad se ha llevado a cabo de la misma manera que en el ejemplo 4, y se han obtenido los mismos resultados. Teniendo en cuenta estos resultados, se ha decidido considerar la concentración de 0,01% como dosis máxima para ensayar la actividad anti-psoriasis de la mezcla de madecassósido y de terminolósido.

b) Tratamientos, extracciones y dosificaciones

Los fibroblastos se pre-cultivaron en frascos de 175 cm² en medio DMEM al 10% en volumen de SVF hasta confluencia, y después el medio de cultivo se sustituyó por un medio DMEM sin suero. Las células se cultivaron a continuación en presencia de los productos ensayados o de las referencias durante 1 hora. El agente pro-inflamatorio “transforming growth factor alpha” (TNF-α, a 25 ng/ml final; Sigma T0157) se añadió a continuación al medio de cultivo y las células se incubaron nuevamente durante 1 hora a 27°C y 5% de CO₂. Después de la incubación, las células se recolectaron sobre hielo y los núcleos celulares de las diferentes muestras se aislaron con la ayuda del kit Sigma NUC-101 según el protocolo preconizado por el fabricante. La cantidad de proteínas de cada extracto de núcleo se determinó con la ayuda del kit de dosificación Biorad 500-0116. La cantidad de NFκB activado, unido al oligonucleótido específico, se midió sobre una misma cantidad de extracto nuclear de cada muestra, es decir, 50 μl, diluido a la mitad, después de la revelación con la ayuda de un anticuerpo específico anti-NFκB. Esta dosificación se realizó con la ayuda del kit de dosificación Mercury transfactor NFκB, BD Biosciences K2058-1, según el protocolo preconizado por el fabricante.

ES 2 329 568 T3

c) Dosificación de NFκB

Los resultados se proporcionan en la tabla 17 siguiente:

5

TABLA 17

Tratamiento	NFκB (UA)	Media	% de control	P
Control no tratado	10,71	9,55	100	-
	8,39			
	8,90			
	10,19			
Control sin TNF-α	0,00	0,26	3	p < 0,01
	0,62			
	0,62			
	-0,21			
Sulfasalazina 5 mM	4,93	4,19	44	p < 0,01
	4,01			
	2,88			
	4,93			
Dexametasona 0,1 μM	10,94	9,46	99	p > 0,05
	7,3			
	9,90			
	9,67			
Mezcla según la invención 0,01%	10,16	9,05	95	p > 0,05
	6,79			
	9,63			
	9,63			

35

UA representa las unidades arbitrarias de NFκB en el extracto; es la diferencia entre el valor medido y el ruido de fondo.

40

El porcentaje basal de NFκB en los núcleos de fibroblastos es muy bajo. El tratamiento por TNF-α a 25 ng/ml ha activado fuertemente el factor de transcripción NFκB, en un factor de 37 aproximadamente con relación al control sin TNF-α. Unos controles que usan un exceso de oligonucleótido han permitido mostrar que casi la totalidad de la respuesta observada era específica de la unión de NFκB. La sulfasalazina a 5 mM, inhibidor de referencia de la translocación de NFκB, ha reducido claramente la activación del factor de transcripción NFκB inducida por TNF-α, 44% del control con TNF-α, p < 0,01.

45

La dexametasona a 0,1 μM no ha inhibido la translocación nuclear de NFκB inducida por TNF-α. Realmente, la dexametasona reprime la transactivación de los genes inducida por NFκB, pero no inhibe la activación de NFκB y su translocación hacia el núcleo. Existe así un efecto inhibitorio de la transcripción pero ningún efecto sobre la translocación de NFκB; la acción de la dexametasona tiene lugar a nivel nuclear, a través del receptor con glucocorticoides, y por lo tanto es posterior a la acción de la sulfasalazina.

50

El producto según la invención ensayado al 0,01% no ha modificado de manera significativa la activación de NFκB inducida por TNF-α, 95% del control. Este resultado no excluye una actividad anti-inflamatoria a través de otro mecanismo.

55

d) Conclusión

60

La no injerencia del madecacosido y de su isómero en la activación de NFκB tiene por consecuencia la transcripción autorizada de los ligandos, tales como las citoquinas y las quimioquinas, inflamatorios que vuelven la célula operacional en un caso de agresión antigénica patógena.

65

El madecacosido y su isómero no tienen ninguna interacción con o contra la activación del NFκB producido por los fibroblastos. La moderación de los ligandos inflamatorios en los desajustes auto-inmunes, IL1, IL8, TNF-α, PGE2 a nivel membranario, indica que el madecacosido y su isómero actuarían más a nivel transduccional (mejor tolerancia en caso de deriva inflamatoria), y a nivel de los sistemas de expresión y/o de síntesis de las proteínas, péptidos u otros ligandos (menor expresión intracelular de las IL).

ES 2 329 568 T3

Ejemplo 11

5 *Evaluación in vitro de los efectos moduladores del asiaticósido y de una mezcla de madecasósido y de terminolósido (50/50 p/p) sobre la producción de metaloproteinasas de la matriz extracelular por unos fibroblastos humanos cultivados en un modelo de dermatitis equivalente*

10 El objetivo de este ejemplo es evaluar los efectos moduladores del asiaticósido y de una mezcla de madecasósido y de terminolósido (50/50 p/p) sobre la protección de las metaloproteinas (MMP) y de sus inhibidores específicos (TIMP) por unos fibroblastos de piel humana cultivados en una dermis equivalente (entramado de colágeno). Se proporciona un enfoque experimental *in vitro*, basado en la medición de los porcentajes de MMP-1 y de TIMP-1 liberados en los medios de cultivo por unos fibroblastos humanos cultivados en ausencia y en presencia de los productos, y estimulados por TNF- α . El estudio se ha realizado sobre unos cultivos de fibroblastos humanos establecidos a partir de biopsias cutáneas según el método de los explantes. Los fibroblastos se cultivan según las técnicas habituales en laboratorio, en medio DMEM (comercializado con la denominación INVITROGEN™ por la compañía Life Technologies) suplementado con suero de ternera fetal (SVF al 10%) y con antibióticos, a 37°C en atmósfera húmeda aire-CO₂ (95%-5%).

a) Citotoxicidad

20 Este estudio de citotoxicidad se ha llevado a cabo de la misma manera que en el ejemplo 6.

• Asiaticósido:

25 Una disolución madre del producto se ha preparado previamente en DMSO y después se ha diluido en un medio de cultivo con el fin de obtener las diferentes disoluciones de ensayo (concentración final de DMSO: 1%). Una gama amplia de 8 concentraciones [de 5 a 1.000 $\mu\text{g/ml}$] se ha estudiado en un primer tiempo con el fin de enmarcar la dosis máxima no citotóxica (D.N.C.). Después de 24 h de contacto, no se registra ningún efecto citotóxico significativo en la gama de las concentraciones ensayadas. A partir de estos resultados, una gama restringida comprendida entre 10 y 1.000 $\mu\text{g/ml}$ se ha establecido con el fin de precisar la dosis máxima no citotóxica (DNC) después de 48 h de contacto. Los resultados (tabla 18) confirman la no toxicidad de las concentraciones inferiores a 1 mg/ml después de 48 h de incubación. La viabilidad celular se reduce sólo en un 12% cuando las células se incuban en presencia del agente activo a 1 mg/ml.

35 TABLA 18

ASIATICÓSIDO (pg/ml)	10	25	50	75	100	250	500	750	1.000
Viabilidad (24h)	98%	101%	101%	n.t.	101%	101%	97%	n.t.	93%
Viabilidad (48h)	108%	107%	106%	104%	102%	99%	93%	90%	88%

• Mezcla madecasósido-terminolósido:

45 Una disolución madre del producto se ha preparado previamente en DMSO y después se ha diluido en un medio de cultivo con el fin de obtener las diferentes disoluciones de ensayo (concentración final de DMSO: 1%). Se ha estudiado una gama amplia de 8 concentraciones (entre 5 y 100 mg/ml] sobre fibroblastos humanos con el fin de enmarcar la dosis máxima no citotóxica (D.N.C.). Después de 24 h de contacto, las concentraciones iguales a 1 mg/ml no inducen ninguna modificación significativa de la captura con rojo neutro. Más allá, se registra un efecto citotóxico dependiente de la dosis. A partir de estos resultados, se ha establecido una gama restringida comprendida entre 0,1 y 10 mg/ml con el fin de precisar la dosis máxima no citotóxica (DNC).

50 Los resultados (tabla 19) confirman la no toxicidad de las concentraciones iguales a 1 mg/ml después de 48 h de incubación.

55 TABLA 19

Mezcla de madecasósido y de terminolósido (mg/ml)	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5	7,5	10
Viabilidad (24h)	98%	98%	n.t.%	96%	n.t.	94%	n.t.	68%	n.t.	60%
Viabilidad (48h)	n.t.	101%	96%	97%	99%	99%	99%	86%	71%	47%

ES 2 329 568 T3

A partir de los resultados de citotoxicidad, la concentración "1 mg/ml" se ha escogido como dosis máxima no citotóxica (DNC), para ensayar los agentes activos asiaticósido y mezcla madecasósido-terminolósido frente a la producción de las MMP.

5 b) Producción de metaloproteinasas

Unos fibroblastos de dermis humana cultivados en monocapa se despegan de su soporte mediante tripsinización y se suspenden en un medio completo. Después de la digitalización, la suspensión celular se diluye en un medio de cultivo y se añade, en unas proporciones definidas, a una mezcla de medio de cultivo concentrada (1,76 x DMEM), de suero de ternera fetal (SVF) y de colágeno de tipo I (extracto del ácido acético a partir de tendones de colas de rata). La mezcla se vierte después, en frío, en unas placas de 24 pocillos a razón de 1 ml/pocillo. Las dermis equivalentes se disponen a continuación a 37°C y se incuban durante 72 h, en atmósfera aire-CO₂ (95%/5%). Los geles se contraen progresivamente bajo la acción de los fibroblastos.

15 72 horas después de la inoculación, el medio de cultivo se elimina y se sustituye por un medio nuevo que contiene los diferentes productos estudiados (tratamiento "preventivo"). Los geles se vuelven a disponer en autoclave a 37°C y se incuban durante 24 horas en atmósfera aire-CO₂ (95%/5%).

Después de la incubación, las placas se vacían. Los cultivos se aclaran y después se exponen a una disolución de TNF- α (10 ng/ml) en ausencia (cultivos de control) o en presencia (cultivos tratados) de las diferentes concentraciones de cada producto estudiado. Después de la adición de TNF- α , los cultivos se vuelven a poner en autoclave a 37°C durante 24 h. Al final de la incubación, los medios se recogen, se centrifugan y se alicuotan para la dosificación de MMP-1 y de TIMP-1.

25 El estudio se ha realizado sobre unos fibroblastos humanos cultivados en un gel tridimensional de colágeno (dermis equivalente).

➤ Condiciones de realización

- 30 1. Tratamiento de las células durante 24 h, antes de la inducción de MMP-1 por TNF- α
2. Inducción de MMP-1 por la adición de TNF- α (10 ng/ml). Incubación durante 24 h.
- 35 3. Medición de la viabilidad celular y de los porcentajes de MMP-1 en los sobrenadantes de los cultivos de control y tratados.

• Asiaticósido:

El asiaticósido se ha ensayado a 3 concentraciones:

$$C_1 = 0,2 \text{ mg/ml} \quad C_2 = 0,5 \text{ mg/ml} \quad C_3 = 1,0 \text{ mg/ml}$$

➤ Viabilidad de las células (ensayo rojo neutro)

45 El tratamiento de las células por el TNF- α a 10 ng/ml no provoca ninguna modificación de la viabilidad celular. No se observa ninguna disminución de la captura del rojo neutro después de la exposición al TNF- α . Asimismo, la viabilidad de los cultivos tratados con el asiaticósido no está modificada después del tratamiento por el TNF- α .

➤ Producción de MMP-1

50 La tabla 20 siguiente agrupa los porcentajes de MMP-1 (1 ng/ml) obtenidos en los sobrenadantes de cultivo después de la activación de las células (+TNF) así como los porcentajes basales (-TNF).

TABLA 20

	Producción de MMP-1 (ng MMP-1/ml)			
	(-) TNF α		(+) TNF α	
Geles de colágeno tratados con	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Control	2,24	0,54	12,11	1,03
Asiaticósido (0,2 mg/ml)	No medido		9,96	0,47
Asiaticósido (0,5 mg/ml)	No medido		6,18	0,15
Asiaticósido (1,0 mg/ml)	No medido		3,40	0,21

ES 2 329 568 T3

A nivel de las células de control, los resultados obtenidos muestran que TNF- α induce una clara estimulación de la producción de MMP-1. El porcentaje basal registrado a nivel de las células no estimuladas se multiplica por 503 después de la estimulación por TNF- α .

5 A nivel de las células tratadas, los porcentajes de MMP-1 registrados después de la estimulación por el TNF- α a nivel de los cultivos tratados con el asiaticósido son inferiores al observado a nivel del control (+)TNF- α .

10 El efecto del asiaticósido frente a la producción de MMP-1 inducida por TNF- α depende de la dosis. Las diferencias registradas a nivel de los lotes C₁ ($p \leq 0,05$), C₂ ($p \leq 0,01$) y C₃ ($p \leq 0,01$) han resultado estadísticamente significativas (ensayo t de Student) con relación al control (+)TNF- α :

- C₁: 18% de disminución del porcentaje de MMP-1
- C₂: 49% de disminución del porcentaje de MMP-1
- C₃: 72% de disminución del porcentaje de MMP-1
- Mezcla de madecasósido-terminolósido

20 La mezcla de madecasósido-terminolósido se ha ensayado a 3 concentraciones:

$$C_1 = 0,2 \text{ mg/ml} \quad C_2 = 0,5 \text{ mg/ml} \quad C_3 = 1,0 \text{ mg/ml}$$

25 ➤ *Viabilidad de las células (ensayo rojo neutro)*

30 La viabilidad de las células tratadas con la mezcla de madecasósido-terminolósido no está modificada después del tratamiento por TNF- α .

➤ *Producción de MMP-1*

35 Los resultados muestran una disminución dependiente de la dosis de los porcentajes de MMP-1 en los sobrenadantes de los cultivos tratados con una mezcla madecasósido-terminolósido y estimulados por TNF- α . Sólo las diferencias registradas a nivel de los lotes tratados C₂ y C₃ son estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$, ensayo t de Student):

- C₁: 3% de disminución del porcentaje de MMP-1
- C₂: 39% de disminución del porcentaje de MMP-1
- C₃: 61% de disminución del porcentaje de MMP-1

45 La tabla 21 siguiente agrupa los porcentajes de MMP-1 (ng/ml) obtenidos en los sobrenadantes de cultivo después de la activación de las células (+ TNF) así como los porcentajes basales (- TNF).

TABLA 21

	Producción de MMP-1 (ng MMP-1/ml)			
	(-) TNF α		(+) TNF α	
Geles de colágeno tratados con	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Control	2,24	0,54	12,11	1,03
Mezcla madecasósido-terminolósido (0,2 mg/ml)	No medido		11,78	0,83
Mezcla madecasósido-terminolósido (0,5 mg/ml)	No medido		7,37	0,76
Mezcla madecasósido-terminolósido (1,0 mg/ml)	No medido		4,76	0,52

ES 2 329 568 T3

c) Producción de TIMP-1

El porcentaje de TIMP-1, inhibidor específico de MMP-1, se ha medido asimismo en los sobrenadantes de los cultivos tratados con el asiaticósido o con la mezcla madecasósido-terminolósido. Cada agente activo se ha ensayado a 3 concentraciones:

$$C_1 = 0,2 \text{ mg/ml} \quad C_2 = 0,5 \text{ mg/ml} \quad \text{y} \quad C_3 = 1,0 \text{ mg/ml}$$

La tabla 22 siguiente agrupa los porcentajes de TIMP-1 (ng/ml) obtenidos en los sobrenadantes de cultivo después de la activación de las células (+ TNF) así como los porcentajes basales (- TNF).

TABLA 22

	Producción de TIMP-1 (ng TIMP-1/ml)			
	(-) TNF α		(+) TNF α	
Geles de colágeno tratados con	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Control	51,20	1,22	48,90	2,16
Asiaticósido (0,2 mg/ml)	No medido		51,01	1,51
Asiaticósido (0,5 mg/ml)	No medido		50,36	1,67
Asiaticósido (1,0 mg/ml)	No medido		48,82	2,22
Mezcla madecasósido-terminolósido (0,2 mg/ml)	No medido		48,63	1,18
Mezcla madecasósido-terminolósido (0,5 mg/ml)	No medido		46,98	2,02
Mezcla madecasósido-terminolósido (1,0 mg/ml)	No medido		48,76	0,92

Los resultados obtenidos muestran que:

- la producción de TIMP-1 por unos fibroblastos cultivados en un gel de colágeno no está modificada por TNF- α
- los agentes activos constituidos por el asiaticósido y por la mezcla madecasósido-terminolósido no ejercen, en la gama de las concentraciones ensayadas, ningún efecto frente a la producción de TIMP-1.

d) Conclusión

Los efectos moduladores de los agentes activos constituidos por el asiaticósido y por la mezcla de madecasósido-terminolósido frente a la producción de metaloproteinasas (MMP) y de sus inhibidores específicos (TIMP) se han observado, *in vitro*, sobre un modelo de dermis humana. El estudio se ha realizado sobre unos fibroblastos humanos normales cultivados en una matriz tridimensional de colágeno. Los efectos de los agentes activos se han evaluado mediante la medición de los porcentajes de MMP-1 y de TIMP-1 en los sobrenadantes de cultivo después de la activación de las células por el TNF- α .

En las condiciones experimentales consideradas, los resultados de este estudio han mostrado que:

- el TNF- α , a dosis no citotóxica (10 ng/ml) induce un importante aumento de la producción de MMP-1. Por el contrario, la producción de TIMP-1 no está modificada después del tratamiento de las células por el TNF- α .
- Los agentes activos constituidos por el asiaticósido y por la mezcla madecasósido-terminolósido son capaces de reducir, de manera dependiente de la dosis, la producción de MMP-1 inducida por el TNF- α . A la mayor concentración ensayada (1 mg/ml), estos dos agentes activos son capaces de reducir respectivamente entre un 72% y 61% el porcentaje de MMP-1 inducido por los TNF- α
- El asiaticósido y la mezcla de madecasósido-terminolósido, en la gama de las concentraciones ensayadas, no tienen efecto frente a la producción de TIMP-1.

El estudio, realizado sobre unos fibroblastos humanos, permite observar bajo el estímulo inflamatorio del TNF- α , un incremento importante (530%) de liberación de MMP1 (colagenasa) en el medio de cultivo. La mezcla de madecasósido-terminolósido, tal como el asiaticósido, disminuyen significativamente, de manera dependiente de la dosis,

ES 2 329 568 T3

la concentración de MMP1 (mezcla de madecassósido-terminolósido = -39% a 500 microgramos/kg y asiaticósido = -49%). La liberación de los inhibidores de MMP1, los TIMP y en particular TIMP1, no está modificada. Este resultado se coteja con los estudios efectuados sobre SKALP (ejemplo 9), puesto que en presencia de la mezcla de madecassósido-terminolósido, una alta concentración de leuco-proteasas no aumenta la secreción de los inhibidores, pero disminuye fuertemente la de los ligandos pro-inflamatorios por los queratinocitos.

Esto implica asimismo que la mezcla de madecassósido-terminolósido y el asiaticósido son activos sobre los dos compartimentos dérmicos que son la epidermis y la dermis.

Ejemplo 12

Actividad anti-inflamatoria del terminolósido, del madecassósido y de la mezcla de heterósidos (madecassósido, terminolósido y asiaticósido)

En este ejemplo, la mezcla de heterósidos está constituida en peso, con relación al peso total de la mezcla, por 40% de terminolósido, 40% de madecassósido y por 20% de asiaticósido.

Con el fin de evaluar la actividad anti-inflamatoria del terminolósido, del madecassósido y de la mezcla de heterósidos, se han estudiado los efectos moduladores de estos tres agentes activos frente a la producción y la liberación de citoquinas epidérmicas pro-inflamatorias (IL-1 α , IL-8, PGE-2) por unos queratinocitos humanos en cultivo, sometidos a un estrés irritativo inducido o bien por el interferón-gamma (IFN- γ) o bien por el PMA. Unos queratinocitos humanos se han aislado a partir de piel humana. Las células se cultivan en medio KGM "serum free" (Keratinocyte Growth Medium, comercializado por la compañía Clonetics®), según las técnicas habituales usadas en laboratorio, a 37°C en atmósfera húmeda aire-CO₂ (95%/5%). Las células se inoculan en unos frascos de 25 cm² y son pasadas regularmente antes de alcanzar la confluencia. El principio del ensayo se basa en la evaluación de la producción de citoquinas pro-inflamatorias por unos queratinocitos humanos, en respuesta a un estrés irritativo. El método se basa en la medición del porcentaje intracelular de IL-1- α y de los porcentajes de IL-8 y de PGE-2 liberados en el medio extracelular por unos queratinocitos cultivados en ausencia y en presencia de los productos estudiados, y estimulados o bien por el interferón-gamma (IFN- γ) o bien por el PMA (forbol-12-miristato 13-acetato).

a) Citotoxicidad

Este estudio de citotoxicidad se ha llevado a cabo de la misma manera que en el ejemplo 6 sobre unos queratinocitos humanos HaCaT y sobre unos queratinocitos humanos normales.

■ Terminolósido:

○ Citotoxicidad sobre queratinocitos humanos HaCaT

La tabla 23 siguiente agrupa el conjunto de los resultados (viabilidad celular en % del control)

TABLA 23

Concentración (mg/ml)	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5	7,5	10
Viabilidad (24h)	105%	104%	105%	105%	n.t.	104%	100%	81%	n.t.	73%
Viabilidad (72h)	n.t.	100%	101%	101%	103%	102%	103%	93%	86%	69%

Después de 24 h de contacto, las concentraciones $\leq 2,5$ mg/ml no inducen ninguna modificación significativa de la respuesta celular frente a RN. Más allá de 2,5 mg/ml, se registra un ligero efecto citotóxico dependiente de la dosis.

○ Citotoxicidad sobre queratinocitos humanos

El estudio de citotoxicidad se ha llevado a cabo mediante un ensayo sobre queratinocitos humanos (cepa K₀₂₋₁H₄) con el fin de confirmar la no toxicidad de las concentraciones sobre las células "diana". La tabla 24 siguiente agrupa el conjunto de los resultados (viabilidad celular en % del control).

TABLA 24

Concentración (mg/ml)	0,25	0,5	0,75	1,0	2,5	5	10
Viabilidad (72h)	101%	103%	103%	102%	99%	96%	69%

ES 2 329 568 T3

Los resultados confirman la no toxicidad de las concentraciones inferiores o iguales a 2,5 mg/ml después de 72 h de incubación.

5 ■ Madecacosido:

- Citotoxicidad sobre queratinocitos humanos HaCaT

La tabla 25 siguiente agrupa el conjunto de los resultados:

10

TABLA 25

15

Concentración (mg/ml)	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5	7,5	10
Viabilidad (24h)	105%	102%	103%	99%	n.t.	100%	85%	75%	n.t.	63%
Viabilidad (72h)	n.t.	101%	102%	102%	101%	101%	92%	76%	71%	56%

20

Después de 24 h de contacto, las concentraciones inferiores a 1,0 mg/ml no inducen ninguna modificación significativa de la respuesta celular frente al RN. Más allá de 1,0 mg/ml, se registra un ligero efecto citotóxico dependiente de la dosis.

25

- Citotoxicidad sobre queratinocitos humanos

El estudio de citotoxicidad se ha completado por un ensayo sobre queratinocitos humanos (cepa K₀₂₋₁H₄) con el fin de confirmar la no toxicidad de las concentraciones sobre las células “diana”.

30

La tabla 26 siguiente agrupa el conjunto de los resultados (viabilidad celular en % del control).

TABLA 26

35

Concentración (mg/ml)	0,25	0,5	0,75	1,0	2,5	5	10
Viabilidad (72h)	102%	101%	102%	101%	97%	88%	72%

40

Los resultados confirman la no toxicidad de las concentraciones inferiores a 2,5 mg/ml. Más allá, se registra un ligero efecto citotóxico dependiente de la dosis.

45 ■ Heterósidos:

- Citotoxicidad sobre queratinocitos humanos HaCaT

La tabla 27 agrupa el conjunto de los resultados (viabilidad celular en % del control)

50

TABLA 27

55

Concentración (mg/ml)	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5	7,5	10
Viabilidad (24h)	102%	103%	99%	100%	85%	85%	75%	n.t.	63%
Viabilidad (72h)	100%	101%	97%	95%	97%	90%	80%	74%	38%

60

Después de 24 h de contacto, las concentraciones inferiores a 1,0 mg/ml no inducen ninguna modificación significativa de la respuesta celular frente al RN. Más allá de 1,0 mg/ml, se registra un ligero efecto citotóxico dependiente de la dosis.

- Citotoxicidad sobre queratinocitos humanos

65

El estudio de citotoxicidad se ha completado mediante un ensayo sobre queratinocitos humanos (cepa K₀₂₋₁H₄) con el fin de confirmar la no toxicidad de las concentraciones sobre las células “diana”. La tabla 28 siguiente agrupa el conjunto de los resultados (viabilidad celular en % del control).

ES 2 329 568 T3

TABLA 28

Concentración (mg/ml)	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0	2,5	5	10
Viabilidad (72h)	97%	97%	99%	93%	88%	64%	34%	12%

Los resultados confirman la no toxicidad de las concentraciones inferiores 0,75 mg/ml. Más allá, se registra un ligero efecto citotóxico dependiente de la dosis. A partir de estos resultados, se consideró la concentración igual a 1 mg/ml como dosis máxima para ensayar la actividad anti-inflamatoria de los tres agentes activos.

b) Efecto del interferón- γ

Los efectos del interferón-gamma (IFN- γ) sobre la producción y la liberación de citoquinas epidérmicas se han estudiado sobre unos queratinocitos humanos normales (cepa K₀₂₋₁H₄). Se han ensayado 4 concentraciones de IFN- γ :

$$C_1 = 100 \text{ U/ml} \quad C_2 = 500 \text{ U/ml} \quad C_3 = 1.000 \text{ U/ml} \quad C_4 = 2.000 \text{ U/ml}$$

➤ Producción de IL-1 α intracelular

Los resultados se proporcionan en la tabla 29 siguiente:

TABLA 29

IL-1 α (pg/ μ g proteínas)	Control	Interferón- γ (U/ml)			
	0	100	500	1.000	2.000
Media	3,25	6,80	8,29	11,21	12,48
Desviación estándar	0,05	0,12	0,12	0,73	0,80

Los resultados obtenidos muestran que el interferón- γ , en la gama de concentraciones ensayadas, induce, de manera dependiente de la dosis, una clara estimulación de la producción de IL-1 α intracelular. El porcentaje basal registrado a nivel de las células no estimuladas (3,25 \pm 0,05 pg/ μ g prot.) se multiplica respectivamente por 2,6 y 3,8 después de la estimulación por IFN- γ a 1.000 y 2.000 pg/ml.

➤ Liberación de IL-8

Los efectos de IFN- γ sobre la producción y la liberación de IL-8 se han estudiado en las mismas condiciones experimentales. Los resultados se proporcionan en la tabla 30 siguiente:

TABLA 30

IL-8 (pg/ μ g proteínas)	Control	Interferón- γ (U/ml)			
	0	100	500	1.000	2.000
Media	0,093	0,252	0,350	0,516	0,671
Desviación estándar	0,013	0,042	0,009	0,004	0,048

Los resultados obtenidos a nivel de los cultivos no estimulados por IFN- γ (-IFN- γ) confirman la ausencia o la presencia de porcentajes muy bajos de IL-8 en los medios de incubación de los queratinocitos en el estado basal. Por el contrario, se observa una clara estimulación de la producción y de la liberación de IL-8 después de la estimulación por IFN- γ . Este aumento dependiente de la dosis del porcentaje de IL-8 intracelular a nivel de los cultivos (+IFN- γ) confirma la función de esta citoquina pro-inflamatoria en la producción y la liberación de IL-8.

ES 2 329 568 T3

➤ Liberación de PGE-2

Los efectos del IFN- γ sobre la producción y la liberación de PGE-2 se han estudiado en las mismas condiciones experimentales que las descritas anteriormente (tabla 31).

TABLA 31

PGE-2 extracelular (pg/ μ g proteínas)	Control	Interferón- γ (U/ml)			
	0	100	500	1.000	2.000
Media	10,49	3,60	3,45	3,48	3,80
Desviación estándar	3,16	0,61	0,32	0,74	0,13

Los resultados muestran que el IFN- γ no es capaz de estimular, en la gama de las concentraciones ensayadas, la producción y la liberación de PGE-2.

c) Actividad anti-inflamatoria

El estudio se ha realizado sobre unos queratinocitos aislados a partir de piel de prepucio de niños jóvenes (cepa K₀₂₋₁H₆).

Cada agente activo, terminolósido, madecasósido y heterósidos, se ha ensayado a 4 concentraciones

$$C_1 = 0,10 \text{ mg/ml} \quad C_2 = 0,25 \text{ mg/ml} \quad C_3 = 0,50 \text{ mg/ml} \quad C_4 = 1,00 \text{ mg/ml}$$

Condiciones de ensayo

1. Tratamiento de las células, durante 48 h, con el producto estudiado antes de la inducción del estrés irritativo; 2. Inducción del estrés irritativo: IFN- γ (1.000 U/ml); 3. Incubación de las células "activadas" durante 24 h en presencia del producto estudiado; 4. Determinación: IL-8 (extracelular) e IL-1 α (intracelular). Dosificación de las proteínas celulares.

➤ Liberación de IL-8

Las tablas 32 a 34 siguientes agrupan los porcentajes de IL-8 obtenidos después de la activación de las células (+IFN- γ) así como los porcentajes basales (-IFN- γ). La producción de IL-8 inducida por el IFN- γ y la actividad anti-inflamatoria (AAI) se han calculado para cada concentración según:

$$A.A.I. = [(IL-8_{\text{(células de control + IFN)}} - IL-8_{\text{(células tratadas-IFN)}}) / IL-8_{\text{(células de control + IFN)}}] \times 100$$

• Terminolósido

TABLA 32

	Control (-IFN- γ)	Control (+IFN- γ)	IFN- γ + TERMINOLÓSIDO			
	-	0 mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
IL-8 (pg/ μ g prot.)	0,099 \pm 0,005	0,843 \pm 0,026	0,862 \pm 0,076	0,762 \pm 0,052	0,708 \pm 0,030	0,492 \pm 0,014
Actividad anti-inflamatoria (%)			0%	9%	15%	42%

Se observa una liberación muy importante de IL-8 a nivel de los cultivos de control después de la estimulación por el IFN- γ . El porcentaje tan bajo de base registrado a nivel de los cultivos no estimulados indica que IL-8 no está presente en el estado basal pero que su expresión y su liberación pueden ser inducidas por el IFN- γ . El porcentaje de base se multiplica por 8,5 después de la estimulación por el IFN- γ . Los porcentajes de IL-8 registrados después de la estimulación por el IFN- γ a nivel de los cultivos tratados con el agente activo terminolósido son inferiores al del control (+)IFN- γ .

ES 2 329 568 T3

El efecto del activo terminolósido frente a la liberación de IL-8 inducida por IFN- γ es dependiente de la dosis. Las diferencias registradas a nivel de los lotes C₂ ($p \leq 0,05$), C₃ ($p \leq 0,01$) y C₄ ($p \leq 0,01$) han resultado estadísticamente significativas (ensayo t de Student) con relación al control (+)IFN- γ . La concentración más alta ensayada (1 mg/ml) es capaz de reducir en un 42% la producción de IL-8 inducida por el IFN- γ .

• Madecasósido

TABLA 33

	Control (-IFN- γ)	Control (+IFN- γ)	IFN- γ + MADECASÓSIDO			
	-	0 mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
IL-8 (pg/ μ g) prot.)	0,099 \pm 0,005	0,843 \pm 0,026	0,656 \pm 0,043	0,643 \pm 0,047	0,614 \pm 0,039	0,368 \pm 0,019
Actividad anti-inflamatoria (%)			21%	24%	27%	56%

Los resultados muestran una disminución dependiente de la dosis de IL-8 a nivel de los lotes tratados con el madecasósido y estimulados por el IFN- γ . Las diferencias a nivel de los lotes C₁, C₂, C₃ y C₄ son estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$, ensayo t de Student). La concentración 1 mg/ml es capaz de reducir en un 56% la producción de IL-8.

• Heterósidos

TABLA 34

	Control (-IFN- γ)	Control (+IFN- γ)	IFN- γ + HETERÓSIDOS			
	-	0 mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
IL-8 (pg/ μ g) prot.)	0,099 \pm 0,005	0,843 \pm 0,026	0,83 \pm 0,04	0,63 \pm 0,1	0,47 \pm 0,06	0,36 \pm 0,01
Actividad anti-inflamatoria (%)			1%	25%	44%	57%

Los resultados muestran una disminución dependiente de la dosis de IL-8 a nivel de los lotes tratados con la mezcla de heterósidos (madecasósido, terminolósido y asiaticósido) y estimulados por el IFN- γ . Las diferencias a nivel de los lotes C₁, C₂, C₃ y C₄ son estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$, ensayo t de Student). La concentración de 1 mg/ml es capaz de reducir en un 57% la producción de IL-8.

➤ Producción de IL-1 α intracelular

Las tablas 34 a 36 siguientes agrupan los porcentajes intracelulares de IL-1 α después de la activación de las células (+IFN- γ) y el porcentaje basal (-IFN- γ). La producción de IL-1 α inducida por el IFN- γ y la actividad anti-inflamatoria (AAI) se han calculado para cada concentración según:

$$\text{IL-1}\alpha\text{producción} = \text{IL-1}\alpha_{(+\text{IFN})} - \text{IL-1}\alpha_{(-\text{IFN})}$$

$$\text{A.A.I.} = \left[\frac{(\text{IL-1}\alpha_{(\text{células de control})} - \text{IL-1}\alpha_{\text{producción}(\text{células tratadas})})}{\text{IL-1}\alpha_{\text{producción}(\text{células de control})}} \right] \times 100$$

ES 2 329 568 T3

• Terminolósido

TABLA 35

	Control (-IFN- γ)	Control (+IFN- γ)	IFN- γ + TERMINOLÓSIDO			
	-	0 mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
IL-1 α (pg/ μ g) prot.)	2,71 \pm 0,09	10,04 \pm 0,44	8,78 \pm 0,77	8,08 \pm 0,43	7,31 \pm 0,38	5,02 \pm 0,13
IL-1 α producción		7,33	6,07	5,37	4,60	2,31
Actividad anti-inflamatoria (%)			17%	27%	37%	68%

A nivel del lote de control, el porcentaje de base de IL-1 α se multiplica por 3,7 después del tratamiento por el IFN- γ , lo que confirma que IL-1 α es una citoquina cuya producción intracelular puede ser inducida por el IFN- γ . Una clara disminución del porcentaje de IL-1 α se registra a nivel de los cultivos tratados con el agente activo terminolósido. El efecto inhibidor es dependiente de la dosis. Las diferencias a nivel de C₁ ($p \leq 0,05$), C₂ ($p \leq 0,01$), C₃ ($p \leq 0,01$) y C₄ ($p \leq 0,01$) son estadísticamente significativas (ensayo t de Student) con relación al control (+)IFN- γ .

El agente activo a 1 mg/ml es capaz de reducir en un 68% la producción de IL-1 α inducida por IFN- γ .

■ Madecasósido

TABLA 36

	Control (-IFN- γ)	Control (+IFN- γ)	IFN- γ + MADECASÓSIDO			
	-	0 mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
IL-1 α (pg/ μ g) prot.)	2,71 \pm 0,09	10,04 \pm 0,44	8,23 \pm 0,57	8,23 \pm 0,64	8,07 \pm 0,69	6,05 \pm 0,37
IL-1 α producción		7,33	5,52	5,52	5,36	3,34
Actividad anti-inflamatoria (%)			25%	25%	27%	54%

Los resultados muestran una disminución de 54% ($p \leq 0,01$) del porcentaje de IL-1 α a nivel de los cultivos tratados con el activo madecasósido a 1 mg/ml. Por el contrario, las concentraciones C₁, C₂ y C₃ parecen ser equivalentes: se observa una reducción de 25% ($p \leq 0,01$) del porcentaje de IL-1 α .

■ Heterósidos

TABLA 37

	Control (-IFN- γ)	Control (+IFN- γ)	IFN- γ + HETERÓSIDOS			
	-	0 mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
IL-1 α (pg/ μ g) prot.)	2,71 \pm 0,09	10,04 \pm 0,44	8,78 \pm 0,13	9,03 \pm 0,83	7,52 \pm 0,38	5,56 \pm 0,39
IL-1 α producción		7,33	6,07	6,32	4,81	2,85
Actividad anti-inflamatoria (%)			17%	14%	34%	61%

Los resultados muestran una disminución de 61% ($p \leq 0,01$) del porcentaje de IL-1 α a nivel de los cultivos tratados con la mezcla de heterósidos a 1 mg/ml.

ES 2 329 568 T3

d) Actividad anti-inflamatoria-estrés PMA

Teniendo en cuenta la ausencia de efecto de IFN- γ sobre la producción y la liberación de PGE-2, el efecto anti-inflamatorio de los activos se ha estudiado sobre unos queratinocitos humanos normales (cepa K₀₂₋₁H₆) estimulados por PMA. Cada activo se ha ensayado a 4 concentraciones:

$$C_1 = 0,10 \text{ mg/ml} \quad C_2 = 0,25 \text{ mg/ml} \quad C_3 = 0,50 \text{ mg/ml} \quad C_4 = 1,00 \text{ mg/ml}$$

10 Condiciones de ensayo

1. Tratamiento de las células durante 48 h con el producto estudiado antes de la inducción del estrés irritativo.
2. Inducción del estrés irritativo: PMA (10 ng/ml).
3. Incubación de las células "activadas" durante 24 h en presencia del producto estudiado.
4. Dosificación de PGE-2 (extracelular) y dosificación de las proteínas celulares.

➤ Liberación de PGE-2

Las tablas 37 a 39 siguientes agrupan los porcentajes de PGE-2 (pg/ μ g prot.) obtenidos después de la activación de las células (+PMA) así como los porcentajes basales (-PMA). La producción de PGE-2 inducida por el PMA y la actividad anti-inflamatoria (AAI) se han calculado para cada concentración según:

$$\text{PGE-2 producción} = [(\text{PGE-2}_{(+PMA)} - \text{PGE-2}_{(-PMA)})]$$

$$\text{A.A.I.} = \left[\frac{\text{PGE-2 producción}_{(\text{células de control})} - \text{PGE-2 producción}_{(\text{células tratadas})}}{\text{PGE-2 producción}_{(\text{células de control})}} \right] \times 100$$

■ Terminolósido

TABLA 38

	Control (-PMA)	Control (+PMA)	PMA + Agente activo "TERMINOLÓSIDO"			
	-	0 mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
PGE-2 (pg/ μ g prot.)	165,8 \pm 19,8	660,0 \pm 51,6	660,0 \pm 29,9	606,80 \pm 63,6	445,7 \pm 16,7	321,0 \pm 21,1
PGE-2 producción		494,2	494,2	441,0	279,9	115,2
Actividad anti-inflamatoria (%)			0%	10,8%	43,4%	68,6%

A nivel del lote de control, la exposición de los queratinocitos al PMA se traduce por una producción y una liberación muy importantes de PGE-2 en los medios de los cultivos de control. El porcentaje de base registrado a nivel de los cultivos no estimulados se multiplica por 4 después de la estimulación por el PMA, lo que confirma que PGE-2 es una citoquina cuya expresión, producción y liberación pueden ser inducidas por el PMA. Los resultados muestran una disminución dependiente de la dosis de PGE-2 a nivel de los lotes tratados con terminolósido y estimulados por el PMA. Las diferencias a nivel de los lotes C₃ y C₄ son estadísticamente significativas (p \leq 0,01, ensayo t de Student). La concentración de 1 mg/ml es capaz de reducir en un 69% la liberación de PGE-2.

ES 2 329 568 T3

■ Madecasósido

TABLA 39

	Control (-PMA)	Control (+PMA)	PMA + MADECASÓSIDO			
	-	0 mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
PGE-2 (pg/μg) prot.)	165,8±19,8	660,0±51,6	622,7±18,9	618,1±20,7	436,3±32,1	348,3±17,8
PGE-2 producción		494,2	456,9	452,3	270,5	182,5
Actividad anti-inflamatoria (%)			7,5%	8,5%	45,3%	63,1%

Una clara disminución del porcentaje de PGE-2 se registra a nivel de los cultivos tratados con el activo madecasósido. El efecto inhibitor es dependiente de la dosis. Sólo las diferencias a nivel de C₃ y C₄ son estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$, ensayo t de Student) con relación al control (+)PMA. El activo madecasósido a una concentración de 1 mg/ml es capaz de reducir en un 63% la producción de PGE-2 inducida por el PMA.

■ Heterósidos

TABLA 40

	Control (-PMA)	Control (+PMA)	PMA + HETERÓSIDOS			
	-	0 mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
PGE-2 (pg/μg) prot.)	165,8±19,8	660,0±51,6	646,5±33,8	515,1±48,4	326,8±15,5	142,1±6,6
PGE-2 producción		494,2	480,7	349,3	161,0	0
Actividad anti-inflamatoria (%)			2,7%	29,3%	67,4%	100%

El efecto inhibitor es dependiente de la dosis. La mezcla de heterósido a una concentración de 1 mg/ml es capaz de inhibir totalmente la producción de PGE-2 inducida por el PMA.

e) Conclusión

La actividad anti-inflamatoria de los activos terminolósido, madecasósido y heterósidos se ha evaluado sobre un modelo *in vitro* por su capacidad para modular la producción de citoquinas epidérmicas (IL-8, IL-1 α y PGE-2) que desempeñan una función clave en las etapas del proceso inflamatorio. El estudio se ha realizado sobre unos queratinocitos humanos normales estimulados por el interferón- γ (IFN- γ) o por el PMA.

La actividad anti-inflamatoria de los activos estudiados se ha apreciado por la medición de los porcentajes de:

- IL-8 e IL-1 α después de la activación por el IFN- γ .
- PGE-2 después de la estimulación por el PMA.

En las condiciones experimentales consideradas, este estudio ha mostrado que:

- el IFN- γ en la gama de las concentraciones ensayadas (100 a 2.000 U/ml) induce, de manera dependiente de la dosis, una clara estimulación de la producción de IL-1 α (intracelular) y provoca la producción y la liberación de IL-8 en los medios de cultivo. Por el contrario, las mismas concentraciones de IFN- γ no son capaces de estimular la liberación de PGE-2,
- el PMA, a dosis no tóxica (10 ng/ml), provoca la liberación de PGE-2 en los medios de cultivo,
- los activos terminolósido, madecasósido y heterósidos son capaces de modular la producción de las interleuquinas IL-8 e IL-1 α así como la de la prostaglandina-2 en respuesta al estrés inflamatorio. La comparación de los porcentajes de citoquinas ha demostrado unos efectos anti-inflamatorios variables según los productos estudiados, el tipo de citoquina considerado y los cambios observados:

ES 2 329 568 T3

- Frente a IL-8

Los tres activos ensayados son capaces de modular, de manera dependiente de la dosis, la producción y la liberación extracelular de esta citoquina.

5

Si se considera el porcentaje de citoquina registrado después del tratamiento de las células con la concentración más alta de agente activo, los 3 productos ensayados pueden clasificarse, en función de su potencial anti-inflamatorio, de la siguiente manera:

10

Heterósidos > Madecasósido > Terminolósido

- Frente a IL-1 α

15

Los tres activos ensayados son capaces de reducir asimismo la producción y la acumulación intracelular de IL-1 α inducida por el IFN- γ . Los 3 productos ensayados pueden clasificarse, en función del efecto anti-inflamatorio máximo, de la siguiente manera:

20

Terminolósido \geq Heterósidos \geq Madecasósido

- Frente a PGE-2

25

Los 2 activos, madecasósido y terminolósido, son capaces de reducir muy claramente la liberación de PGE-2 inducida por el PMA. La mezcla de heterósidos es capaz de inhibir totalmente la producción de PGE-2 inducida por el PMA. Estos resultados permiten clasificar los productos de la siguiente manera:

30

Heterósidos > Madecasósido \approx Terminolósido

Teniendo en cuenta la función importante de estas citoquinas en el proceso inflamatorio, la capacidad manifestada por los activos terminolósido, madecasósido y heterósidos para modular, de manera importante, la producción de las interleuquinas IL-8 e IL-1 α , así como la de la prostaglandina-2 por unos queratinocitos estimulados *in vitro*, se puede considerar como un elemento muy favorable para la actividad “anti-inflamatoria” buscada.

35

Técnica anterior

40

Sahu NP, Roy SK, Mahato SB. Spectroscopic determination of structures of triterpenoid trisaccharides from *Centella asiatica*. *Phyto chemistry* 1989, Vol. 28, n° 11, p. 2852-2854.

45

Brinkhaus B., Linder M., Schuppan D., Hahn G. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East-Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine*, vol. 7, n° 5, p. 427-448.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un extracto de *Centella asiatica* que comprende una mezcla de madecasósido, de terminolósido y de asiaticósido, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:

- a) extraer las partes aéreas de *Centella asiatica* mediante un disolvente alcohólico;
- b) pasar sobre resina aniónica la disolución alcohólica obtenida en la etapa a);
- c) deslipidar selectivamente por extracción líquido/líquido el eluado obtenido en la etapa b);
- d) concentrar la fase hidroalcohólica deslipidada hasta una fase acuosa con filtraciones sucesivas;
- e) pasar sucesivamente sobre resina catiónica y después sobre resina aniónica la fase acuosa obtenida en la etapa d);
- f) estabilizar la fase acuosa obtenida en la etapa e) mediante la adición de alcohol, y obtener una mezcla que comprende madecasósido, terminolósido y asiaticósido.

2. Procedimiento de preparación de un extracto de *Centella asiatica* que comprende una mezcla de madecasósido y de terminolósido, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) extraer las partes aéreas de *Centella asiatica* mediante un disolvente alcohólico;
- b) pasar sobre resina aniónica la disolución alcohólica obtenida en la etapa a);
- c) deslipidar selectivamente por extracción líquido/líquido el eluado obtenido en la etapa b);
- d) concentrar la fase hidroalcohólica deslipidada hasta una fase acuosa con filtraciones sucesivas;
- e) pasar sucesivamente sobre resina catiónica y después sobre resina aniónica la fase acuosa obtenida en la etapa d);
- f) estabilizar la fase acuosa obtenida en la etapa e) mediante la adición de alcohol;
- g) cromatografiar selectivamente la fase hidroalcohólica pre-purificada obtenida en la etapa f); y
- h) recuperar la mezcla de madecasósido y de terminolósido en su forma final.

3. Procedimiento de extracción según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la resina aniónica usada en la etapa b) es una resina aniónica fuerte con unos grupos funcionales de tipo amonio cuaternario.

4. Procedimiento de extracción según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la resina catiónica usada en la etapa e) es una resina catiónica fuerte con unos grupos funcionales de tipo sulfonatos.

5. Procedimiento de extracción según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la resina aniónica usada en la etapa e) es una resina aniónica fuerte con unos grupos funcionales de tipo amonio cuaternario.

6. Procedimiento de extracción según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizado** porque el disolvente usado durante la cromatografía selectiva de la etapa g) es una mezcla de agua y de etanol en unas proporciones agua/etanol comprendidas entre 50/50 y 90/10 en volumen/volumen.

7. Procedimiento de extracción según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizado** porque la fase estacionaria usada durante la cromatografía selectiva es una fase estacionaria apolar, en particular una fase estacionaria constituida por sílices apolares injertadas, teniendo los injertos apolares de 2 a 18 átomos de carbono.

8. Procedimiento de extracción según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, **caracterizado** porque la mezcla de madecasósido y de terminolósido se obtiene con una pureza superior a 95% en masa con relación al peso del extracto.

9. Procedimiento de extracción según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, **caracterizado** porque la mezcla de madecasósido y de terminolósido obtenida tiene una relación másica de madecasósido:terminolósido comprendida entre 30% y 70%, ventajosamente entre 40% y 60%.

10. Procedimiento de extracción según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, **caracterizado** porque comprende además, en paralelo, una etapa de estandarización de la mezcla obtenida en la etapa f) mediante la adición de una

ES 2 329 568 T3

cantidad apropiada de un extracto que comprende más de 95% en masa de una mezcla de madecasósido o de terminolósido, en el que la mezcla tiene ventajosamente una relación másica en madecasósido:*totum* comprendida entre 30% y 70%, más ventajosamente entre 40% y 60%, de manera que el extracto final así obtenido tenga una pureza comprendida entre 90 y 98% en peso con relación al peso total del extracto final.

5

11. Uso de un extracto de *Centella asiatica*, obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, para la preparación de un medicamento que tiene una actividad anti-inflamatoria.

10

12. Uso según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el medicamento está destinado al tratamiento de las enfermedades auto-inmunes, de las enfermedades inflamatorias crónicas, de las enfermedades atópicas o de las enfermedades intestinales.

15

13. Uso según la reivindicación 11 ó 12, **caracterizado** porque el medicamento está destinado al tratamiento de la psoriasis, del vitíligo, de la pitiriasis, de las esclerodermias, de las dermatosis bullosas, del eczema, de la dermatitis atópica, de la alergia o de la artritis reumatoide.

20

14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, **caracterizado** porque el medicamento está destinado a la prevención y al tratamiento de los derivados inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento y sus consecuencias.

25

15. Uso según la reivindicación 14, **caracterizado** porque el medicamento está destinado a la prevención y al tratamiento de las enfermedades seleccionadas de entre las sensibilizaciones anafilácticas, las anomalías pigmentarias de la piel, la hipervascularización dérmica, y las grietas inflamatorias.

30

35

40

45

50

55

60

65