REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PCT PATENTE DE INVENCIÓN

EXPEDIENTE :

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 15-288424- -00000-0000
Fecha: 2015-12-03 13:03:57 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act: 411 PRESENTACION Folios: 58

TITULO: : **Un Glicerol Filmógeno para Aplicación Tópica**

CLASE : **A61K 47/10 (2006.01) / A61K 9/00 (2006.01)**
A61Q 19/04 (2006.01) / A61K 9/10 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)

INVENTORES : **Rémi Shrivastava / Léa Shrivastava**
Ravi Shrivastava

SOLICITANTES : **Rémi Shrivastava / Léa Shrivastava**

DOMICILIO : **Cebazat, Francia**

APODERADO : **Juan Carlos Cuesta Quintero**

FECHA : **Diciembre de 2015**

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 15-288424- -00000-0000

Fecha: 2015-12-03 13:03:57 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act: 411 PRESENTACION Folios: 58

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

① SOLICITUD DE:

[X] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II

② SOLICITANTES (71)

Nombres: Rémi Shrivastava / Léa Shrivastava

Dirección: 43 bis Route de Chateaugay, F-63118 Cebazat, Francia (FR)

Nacionalidad o Domicilio: Alemania

Lugar de Constitución:

Teléfono: Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. [ ] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [X]

Cual _____

Número _____

③ REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre Juan Carlos Cuesta Quintero

Dirección Calle 72 No. 10-07 Of. 603

Teléfono: 2113097 Fax: 2554538

E-mail: contacto@cuestalawyers.com

IDENTIFICACION

C.C. [X] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Número 79.339.809 TP 43.273

④ INVENTORES (72)

Rémi Shrivastava / Léa Shrivastava / Ravi Shrivastava

Dirección: 43 bis Route de Chateaugay, F-63118 Cebazat, Francia (FR).

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2013/061835 Fecha 07/06/2013

Publicación Internacional No. WO/2014/194966 A1 Fecha 11/12/2014

⑥ TITULO (54)

Un Glicerol Filmógeno para Aplicación Tópica.

⑦ Clasificación Internacional (51) A61K 47/10 (2006.01) / A61K 9/00 (2006.01) / A61Q 19/04 (2006.01) A61K 9/10 (2006.01) / A61K 31/05 (2006.01)

⑧ Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
Si [ ] No [ ]			

⑨ Comprobante de pago No. 15- Fecha 03/12/2015

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

(10) ANEXOS

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [X] Poderes si fuere el caso
- [ ] Documeto de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [X] Copia de la solicitud internacional
- [X] Traduccion de la solicitud internacional al castellano.
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la autoridad Internacional de Examen Preliminar
- [ ] Traduccion del Examen Preliminar efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso el caso copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite al licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indigenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito de material biológico
- [ ] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, realcionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- [ ] De ser el caso modificaciones efectudas a la solicitud internacional

- [ ] Otros

(11) FIGURA CARACTERISTICA:

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO

FIRMA:

C.C. 79.339.809 T.P. 43.273 del C.S. de la J.

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN

☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ▨ PCT modelo

(21) No. De solicitud PCT/EP2013/061835	(51) int. Cl: A61K 47/10 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01) A61Q 19/04 (2006.01) A61K 9/10 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)
(22) Fecha de solicitud 07/06/2013	Rémi Shrivastava Léa Shrivastava
(30) Prioridad: (33) País:	(72) Interventor (es) Rémi Shrivastava Léa Shrivastava Ravi Shrivastava
	(74) Apoderado (s) Juan Carlos Cuesta Quintero

(54) Título
UN GLICEROL FILMÓGENO PARA APLICACIÓN TÓPICA.

Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT

(85) Fecha límite inicio Fase Nacional 04/12/2015 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud *Fecha:* 07/06/2013 *No. de solicitud PCT:* PCT/EP2013/061835	(87) Publicación internacional Fecha (11/12/2014) No. Publicación WO 2014/194966 A1

Resumen reivindicación (es):

Una preparación para aplicación tópica que comprende glicerol y taninos vegetales, en la que los taninos vegetales tienen la capacidad de unirse al glicerol de modo que el glicerol tenga una cualidad filmogénica.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
11 December 2014 (11.12.2014)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2014/194966 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 47/10 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61Q 19/04 (2006.01) *A61K 9/10* (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2013/061835

(22) International Filing Date:
7 June 2013 (07.06.2013)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(72) Inventors; and
(71) Applicants : **SHRIVASTAVA, Rémi** [FR/FR]; 43bis Route de Châteaugay, F-63118 Cebazat (FR). **SHRIVASTAVA, Léa** [FR/FR]; 43bis Route de Chateaugay, F-63118 Cebazat (FR).

(72) Inventor: **SHRIVASTAVA, Ravi**; 43bis Route de Châteaugay, F-63118 Cebazat (FR).

(74) Agent: **LARCHER, Dominique**; 90333, B, Technopôle Atalante, 16B rue de Jouanet, Bretagne, F-35703 Rennes Cedex 7 (FR).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO/CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

WO 2014/194966 A1

(54) Title: COMPOSITION FOR TOPICAL APPLICATION COMPRISING GLYCEROL AND TANNINS

(57) Abstract: A preparation for topical application comprising glycerol and plant tannins, wherein the plant tannins have the capacity to bind to glycerol so that the glycerol has filmogen quality.

COMPOSITION FOR TOPICAL APPLICATION COMPRISING GLYCEROL AND TANNINS

BACKGROUND

Almost all the skin and mucosa injuries, whether of bacterial, viral, immunological or traumatic origin, involve cellular damage, and their healing is directly related to the replacement of damaged cells. In order to grow, cells need a hydrated and clean, pathogen-free, chemical-free, waste protein- and proteolytic enzyme-free environment. Under these conditions, the mother cells secrete a cellular matrix composed of free particles of collagen, elastin, laminin, fibronectin and other proteins, which form a cushion for the attachment of daughter cells. In absence of this matrix, daughter cells have no support to attach onto and therefore cannot grow; consequently, the injury cannot heal.

Topical skin and mucosa injuries involving cellular damage are extremely difficult to heal as, in addition to containing dead cells, cell debris, and multiple proteolytic enzymes which impede cell growth and wound repair, those lesions remain open to the external environment and often get contaminated. This is the reason why most chronic wounds such as bedsores, diabetic ulcers, or venous leg ulcers, never heal, and nearly 40% patients die before they experience wound resolution.

Currently, there is no single substance or product having all the multiple and essential properties needed, and there is no complete treatment available for skin and mucosa injuries. For example, there is presently no treatment for healing chronic wounds. All the drugs available either act as antiseptics, antibiotics to reduce microbial growth, as hydrogels or alginates to keep the wound hydrated, as analgesics or anesthetics to reduce the pain, as collagen- or hyaluronic acid-containing preparations to supply one of the cellular matrix' components, or consist of bioengineered skin or epidermal grafts to replace the skin, but none of these treatments is directed to clean the injury and to favor the natural skin or mucosa repair process by promoting cell growth.

The same lack of efficient treatment is true for topical viral infections such as labial herpes, genital herpes, rhinosinusitis, and influenza, where huge amounts of free virus particles are present on the infected biological surface and continue attacking new healthy cells with the help of topically available proteases. A virus infection is often mediated through multiple proteases present on the surface of the injury. Presently, there is no drug to reduce the amount of free virus particles or of proteases, the main agents of infection. To treat viral throat infection, sea water or salt water gargarism is still considered one of the best remedies

as these osmotically active solutions form a hypertonic film over the throat mucosa and the resulting outward exudation of hypotonic liquid helps reduce the contaminant load on the throat surface. Unfortunately, this hypertonic solution film gets diluted within a few minutes by the outflowing hypotonic liquid, limiting the efficacy of that treatment. Increasing the concentration of salt or other osmotic ingredients is not recommended because of the resulting strong irritation, cellular damage and mucosa burning, or because the presence of a toxic chemical in the vicinity of cells would block cell growth.

Therefore, it is highly important to find a substance capable of fulfilling the multiple requirements of cleaning the infected surface of all the contaminants, such as free-floating bacteria, virus particles, dead cells, cell debris, dead proteins, matrix metalloproteases, growth factors, cytokines, proteases, or dust particles, so as to provide the environment essential for cell growth and tissue repair, without any toxic effect on the cells or the cellular matrix.

Glycerol, a polyol with multiple hydroxyl groups, is a viscous, transparent, safe, osmotically active, hydrophilic solution of natural or synthetic origin. Glycerol is commonly used as a food ingredient, preservative, and humectant, and enters into the composition of many cosmetics and pharmaceuticals. Glycerol is widely employed for topical application on wounds and burns, often as an excipient in association with other active ingredients. In all these preparations, glycerol is used as vehicle, diluent, viscosity enhancer, humidifier, or taste modulator but not as an active ingredient to treat a topical skin or mucosa pathology.

An injured skin or mucosa acts as a semi-permeable membrane and allows osmosis to occur. The flow of solvents across a semi-permeable membrane constitutes the osmotic flow or osmosis. The pressure required to achieve osmotic equilibrium is known as osmotic pressure. The higher the concentration of a solvent, the more osmotic pressure it exerts. Fresh water is considered isotonic with a density of 1000 kg/m^3. Seawater and glycerol have densities of 1025 kg/m^3 and 1259 kg/m^3, respectively. Osmotic pressure exerted by glycerol is nearly 10 times higher compared to seawater. The solute concentration of glycerol is also much higher compared to seawater. It is the total solute concentration in a solution that determines the osmotic flow of liquid, as osmosis is driven by differences in solute/solvent concentrations that exist across a semi-permeable membrane. The total solute concentration can be determined through the osmolality of the solution. The osmolality of seawater, containing 3.4% NaCl, is 0.581 mols/kg (total solute/mol wt/kg), compared to 10.86 mols/kg for glycerol. This shows that pure glycerol is nearly 18 times more osmotically active than seawater. Therefore, glycerol could have been a product of choice for application on infected surfaces in order to generate

osmotic outflow of hypotonic liquid and to clean the injury. Unfortunately, the exudating hypotonic liquid immediately dilutes the glycerol and drains it from the wound surface within a few minutes, limiting these cleaning effects.

There is therefore a need for a safe and non-irritant treatment with the multiple properties of being hydrating, cleaning, antiseptic, and also having antibacterial, antiviral, and anti-protease activity.

WO 00/74668 discloses the use of hypertonic osmotically active solutions for the treatment of topical injuries concerning the use of glycerol as viscous solution for topical application for the treatment of ulcers or superficial injuries, comprising glycerol as active principle and a hydro-glycerinated extract of *Alchemilla vulgaris* as cell growth-promoting agent. However, the glycerol used in WO 00/74668 is not filmogen and therefore cannot provide for the above detailed advantages. The use of glycerol alone as a therapeutic agent to clean infected or damaged tissue is not common because, due to osmosis, the phenomenon of hypotonic liquid outflow from the inner parts of the tissue, glycerol gets diluted within a few minutes, progressively loses its osmotic properties and activity, and does not satisfactorily act as a total cleaning agent. The glycerol film should remain on the semi-permeable live tissue membrane for at least 30 minutes to generate sufficient osmosis to clean the biological tissue surface.

The present invention deals with the problem of how to improve the retention time of the glycerol film by a live biological surface in order to overcome the above-mentioned disadvantages.

Secondly, Cryopreservation is a process where cells, whole tissues, or any other substances susceptible to sustain damage caused by chemical reactivity or time, are preserved by cooling to subzero temperatures. At low enough temperatures, any enzymatic or chemical activity, which might cause damage to the material in question, is effectively stopped. Cryopreservation methods seek to reach low temperatures without engendering additional damage caused by the formation of ice crystals during freezing. For long term live cell storage, the cryoprotectant must be non-toxic to the cells and be able to prevent crystal formation. This is particularly important for live cell and tissue storage or preservation (example: skin graft) since the chances of successful cell revival or tissue grafting diminish as the number of dead or dying cells increases.

Currently, DMSO (Di-Methyl-Sulfoxide), human or fetal calf serum (FCS), and glycerol are used as cryoprotective medium to protect the cells against freezing temperatures and water crystal damage, and thus minimize cell mortality. Unfortunately, none of these cryopreservants is

capable of preserving the cells over a long period of time, i.e. a few months to a few years. Normally, 30-40% cells die within a few days and over 50% within a few months of live cell cryopreservation (Bravo et al. Burns 26(4), 367-78, 2000), due particularly to cellular damage caused by the formation of water crystals.

There is therefore an urgent need to find a cryopreservant which is capable of forming a thin film around the cells or the tissue and protect them from external aggressions as well as from the formation of water crystals in order to enhance cell viability.

SUMMARY

To solve the above detailed problems, the inventors provide a glycerol preparation containing specific plant tannins capable of binding to glycerol molecules and thereby improving the filmogenic properties and retention time period of the glycerol preparation on semi-permeable biological membranes. This filmogen glycerol can be used as a natural and safe treatment for topical application, to treat various skin and mucosa infections and to protect live tissues during cryopreservation.

Present invention therefore deals with a preparation for topical application comprising glycerol and plant tannins. The plant tannins have the capacity to bind to glycerol so that the glycerol has filmogen qualities.

In one embodiment, the plant tannins are chosen from proanthocyanidins.

In a preferred embodiment, these proanthocyanidins are obtained from parts of a plant, or the whole plant, the plant being selected from *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, *European elder*, *Camellia sinensis*, *Glycine max*, *Acacia catechu*, *Fraxinus chinensis*, *Gingko biloba*, *Ribes nigrum*, *Tenacetum parthenium*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Opunitia sp.*, *Morus alba*, *Rubus sp.*, *Quercus sp.*, *Pinus sp.*, and combinations thereof.

In a more preferred embodiment, the proanthocyanidin-rich tannin fraction is obtained from parts of a plant, or the whole plant, the plant being selected from *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, *European elder*, *Camellia sinensis*, *Ribes nigrum*, *Acacia catechu*, *Fraxinus chinensis*, *Gingko biloba*, *Glycine max*, and combinations thereof.

In another embodiment, the proanthocyanidins are synthesized instead of being obtained from plants.

In one embodiment the glycerol content in the preparation is comprised between 30% and 99.99% (v/v).

In one embodiment, the preparation comprises an active ingredient. The active ingredient can be selected from a drug, an antibiotic, an antiseptic, a nutrient, an antibody, a growth factor or a protein.

Present invention furthermore deals with the use of the above-described preparation for the treatment of skin and mucosa infections.

The above-described preparation can further be used for protecting, transporting, storing or freezing cells, tissues or organs. In one embodiment the concentration of filmogen glycerol in the final solution compared to other diluents present in the final solution, such as for example FCS, culture medium, and DMSO, varies between 2 and 50% (v/v), preferably between 10 and 30% (v/v) and more preferably between 15 and 20% (v/v).

Present invention also relates to a method of enhancing the retention time of a glycerol film by a biological surface by preparing a solution of glycerol and plant tannins having the capacity to bind to glycerol molecules, and applying the solution onto the biological surface.

Present invention also relates to a method of treating skin and mucosa infections comprising the step of applying a preparation as described above on the affected area.

Present invention also relates to a method of preparing filmogen glycerol comprising mixing glycerol or a polyol solution with glycerol-binding plant tannins. In one embodiment the plant tannins can be added as a powder or a liquid.

The amelioration of filmogen qualities of glycerol with the addition of tannins and a substantial increase in the therapeutic efficacy of filmogen compared to non-filmogen glycerol, are shown in the studies as described in the examples and in the following figures:

FIGURES

Fig. 1: Measurement of solubility of glycerol alone compared to filmogen glycerol through thermogravimetric analysis (TGA).

Fig. 2: Film retention duration of filmogen glycerol compared to normal glycerol on diabetic wounds.

Fig. 3: Measurement of mean global symptom severity of Psoriasis, Eczema & Dermatitis (PED) manifestations: Effects of Glycerol alone - Control Group.

Fig. 4: Measurement of mean global symptom severity of Psoriasis, Eczema & Dermatitis (PED) manifestations: Effects of filmogen glycerol; Active Treatment Group: treated with filmogen glycerol VB-DERM as per Example 5 preparation n° 11, and 51. Results show that filmogen glycerol totally removes all the free particles of growth-stimulating cytokines, interleukines, and interferons, and normalizes skin cell growth.

Fig. 5: Amelioration in the quality of life of PED patients treated with Filmogen Glycerol compared to normal Glycerol.

Fig. 6: Effects of respective treatments (Filmogen Glycerol compared to normal Glycerol) on Overall PED Severity.

Fig. 7: Overall rhinosinusitis condition; control group treated with normal glycerol spray; filmogen glycerol group treated with a spray of filmogen glycerol as per example 5 – preparation n° 5.

Fig. 8: Antibiotherapy; the comparative necessity to use antibiotic treatment in the control group and the filmogen glycerol group.

Fig. 9: Effects of Orosol (filmogen glycerol) compared to control treatment (glycerol alone) on Mucositis.

DETAILED DESCRIPTION

Present invention deals with a filmogen glycerol preparation for topical application comprising glycerol and plant tannins. The plant tannins have the capacity to bind to glycerol so that the glycerol has filmogenic properties. This filmogen quality leads to an enhancement of the retention time of the glycerol film by a live biological surface. As such the preparation is intended for use for the treatment of skin and mucosa infections.

The term filmogen glycerol indicates a glycerol solution containing specific, natural or synthetic tannins or fractions of tannins, which, when applied on a semi-permeable live biological membrane, forms a film which resists the mechanical forces exerted on it much better than normal glycerol would. When normal, commercially available, glycerol is applied on a semi-permeable biological membrane, the hypertonic nature of glycerol attracts hypotonic liquid from the inner parts of the live tissue, which causes the glycerol to get rapidly diluted, lose osmotic power and stop its activity within 10-15 minutes after application. On the other hand, a filmogen glycerol resists the outward liquid flow pressure exerted on it, and gets diluted only slowly, therefore conserving its osmotic power for a much longer period of time than normal glycerol, i.e. 30 minutes to a few hours depending upon the site of application and the outward liquid flow pressure.

Glycerol, also known as glycerine or glycerin, includes per definition sugar alcohol compounds containing more than one hydroxyl group (OH), attached to separate carbon atoms of an aliphatic skeleton. This group includes glycols, glycerol, and pentaerythritol and also such products as trimethylolethane, trimethylolpropane, 1,2,6-hexanetriol, sorbitol, inositol, Xylitol, and poly(vinyl alcohol). Polyols may be obtained from natural sources or can be synthesized.

We selected the most commonly used polyol i.e. glycerol. Glycerol is a hypertonic viscous sugar alcohol solution, which attracts hypotonic liquid present in the deeper tissues underlying the live biological surface through osmosis, thereby hydrating that surface. Unfortunately, the outward hypotonic liquid flow thus generated dilutes glycerol and progressively diminishes this effect within a few minutes. The outward exudation of hypotonic liquid and consequently the cleaning effects of glycerol only last for a period of 5 to 20 minutes, requiring frequent applications, which is not practical. This is the reason why, despite being a good osmotic agent, glycerol is used only as a humectant and not as a proper drug for the treatment of topical injuries.

Filmogen glycerol signifies a viscous liquid glycerol which forms a thin osmotically active, semi-permeable, flexible, non-plasticizer film capable of attracting hypotonic liquid from the live biological surfaces onto which it is applied and capable of better resisting disintegration or water solubility compared to standard glycerol.

Tannins comprise natural astringent polyphenolic compounds containing sufficient hydroxyl and other suitable groups such as carboxyls to form strong complexes with proteins and various other macromolecules such as sugars.

Tannins may be of natural origin, such as plant tannins, or synthetic. Being highly branched and large molecules, monomer, dimer and polymer tannins have more chances of binding with adjacent sugars or other molecules compared to small and simple flavones. The presence of hydroxyl groups on tannins permits the formation of stable cross-links with macromolecules such as polyols, and this crosslinking helps improve the mechanical resistance of the polyol (glycerol) film. Because of the multiple toxic effects of synthetic polymers cited in the literature, the inventors postulated that vegetal tannins, having a strong affinity for binding with proteins but equally with other macromolecules such as polysaccharides, carbohydrates and sugars, may, when added to the polyols, improve the filmogenic properties of the polyol, e.g. glycerol. Tannins constitute an excellent solution as: (1) tannins are inert molecules and have no interactions with cellular structures; (2) tannins are non-toxic and non-irritant when applied onto a live tissue; (3) tannins are very big molecules and cannot enter the cells; and (4) tannins can be incorporated into glycerol to form a homogenous solution.

Generally, tannins are classified into two broad groups: hydrolysable and condensed tannins. As the name indicates, hydrolysable tannins are quickly hydrolyzed by acids or enzymes, and the products of this hydrolysis are gallic acid or ellagic acid. Upon dry distillation, gallic acid and other components get converted to pyrogallol. Condensed tannins are much more resistant to

hydrolysis. They are formed by flavonoid pigments. In presence of mineral acids or enzymes, they are decomposed into red colored phlobaphenes that are water insoluble. Proanthocyanidins (PCDs) are condensed phenolic polymers containing flavan-3-ol units linked together through C4-C6 or C4-C8 bonds. Structural variation of proanthocyanidins ranges from dimers and trimers to more complex oligomers and polymers depending on the number of catechin linkages, hydroxylation and stereochemistry at the three chiral centers (carbon 2, 3 and 4) of the C-ring which is not susceptible to cleavage by hydrolysis. The inventors have observed that the procyanidins (PCDs) formed from 2 to 5 catechin or epicatechin molecules are especially well suited for macromolecular binding.

In one embodiment of present invention the plant tannins are chosen from proanthocyanidins or procyanidins (PCDs).

In a preferred embodiment these proanthocyanidins are obtained from parts of a plant, or the whole plant, the plant being selected from *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, *European elder*, *Camellia sinensis*, *Glycine max*, *Acacia catechu*, *Fraxinus chinensis*, *Gingko biloba*, *Ribes nigrum*, *Tenacetum parthenium*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Opunitia sp.*, *Morus alba*, *Rubus sp.*, *Quercus sp.*, *Pinus sp.*, *Rheum emodi* and combinations thereof.

In another embodiment the proanthocyanidins are synthesized instead of being obtained from plants.

The inventors have found out in the wake of their studies (see example 3- Pharmacological studies) that certain PCDs or their combinations) are very highly filmogenic, meaning that they increase the glycerol film retention duration between 200 and 300% compared to glycerol alone. These combinations preferably consist of: *Vaccinium myrtillus* (fruit extract) + *Vaccinium macrocarpon* (fruit extract); *Vitis vinifera* (seed extract) + *European elder* (fruit extract); *Camellia sinensis* (leaf extract) + *V. myrtillus*; *V. myrtillus* + *E. elder*; *C. sinensis* + *V. vinifera* + *E. elder*; V. *Vinifera* + *E. elder* + *Glycine max* (seed extract); *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. vinifera;* and *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. myrtillus* + *V. vinifera.*

In comparison to that, the following tannin-rich plant extracts combinations have been found to have high filmogenic qualities, meaning that they increase the film retention duration between 100 and 200% compared to glycerol alone: *Acacia catechu* + *Fraxinus chinensis* (bark and whole plant); *F. chinensis* + *Salvia officinalis* + *G. biloba*; *Rosmarinus officinalis* + *Ribes nigrum*; *Gingko biloba* (roots) + Synthetic polymers.

In addition, another group has been specified as having moderately filmogenic qualities, meaning that they increase the film retention duration between 20 and 99 % compared to glycerol alone: *Morus alba* (fruits) + *Rubus sp.* (fruits); *Quercus sp.* (fruits, bark)+ *Pinus sp.* (bark, fruit). *Tenacetum parthenium* (flowers and leaves) + *Salix alba* (whole plant); *Rheum emodi+ Opunitia Sp.* (fruits) + *Pinus sp* (bark).

These combinations are interchangeable.

It is well known that polyols and polymers contain sufficient free oxygen molecules to form strong hydrogen bonds with the hydroxyl group of the phenolic compounds. Many studies have been conducted with synthetic or natural, water soluble or water insoluble, purified or crude, polymers to investigate the bioavailability and digestibility of plant tannins, to prepare synthetic polymers and plastics, to improve the viscosity or rigidity of materials or to quantify tannins, but the use of tannins or polymers to improve the filmogenic properties of glycerol for topical application to treat skin or mucosa injuries has never been studied.

It is to be understood that present invention does not concern the use of glycerol as plasticizer or the use of glycerol as humectant on the skin. The addition of tannins in glycerol does not change the viscosity of glycerol or of the glycerol film on the biological membrane but enhances the adherence of glycerol onto the live biological membrane.

The aim of the research conducted by the inventors was to identify plant tannins, particularly the procyanidin (PCDs) fraction of plant tannins, which can bind with glycerol molecules to form a mechanically resistant glycerol film able to remain intact over the biological membrane during the exudation of hypotonic liquid. The purpose being to implement this optimally bio-adhesive, osmotically active, hypertonic and safe film as an effective treatment to clean injuries, remove contaminants from the injury, keep the injury hydrated, protect the cellular matrix and prepare a favorable ground for cell growth in a non-toxic, chemical-free environment.

The inventors identified specific glycerol-binding plant tannins capable of improving the mechanical resistance of the glycerol film and thereby keeping the film intact over live cells for a much longer period of time compared to glycerol alone. This increased duration of retention of the filmogen glycerol over a damaged skin or mucosal surface effectively hydrates and cleans the biological surface as well as removes all the free-floating contaminants present on the surface. The absence of contaminants and a clean and humid environment accelerate the healing of the injured tissue. Glycerol film equally protects the injured surface from external aggressions.

Glycerol is also used as a cryoprotectant while freezing cells and tissues at low temperatures (-70 to -196°C). The hydroxyl groups of glycerol interact with H_2O and block the crystal-forming properties of water. The molecular organization of H_2O is modified, leading to less water crystal formation during freezing and low cellular damage. Glycerol is generally used up to a concentration between 5 and 20% along with DMSO (1-5%), serum (10-20%) and culture medium for freezing cells and live tissues. DMSO makes the cell membrane porous, which protects the cells from damage during thawing while glycerol protects the membrane structures and maintains the nature of internal proteins. Above a concentration of 20%, glycerol becomes too hypertonic and damages the cell due to its osmotic effects. Unfortunately, cell survival with these cryoprotectants rarely exceeds 60%, leading to poor grafting of the stored tissues. Higher concentrations of any of these ingredients were not found to enhance cell survival. The poor cell survival rate is due to the fact that in spite of high concentrations of glycerol molecules present around the live cell membranes, cellular dehydration during freezing liberates a large number of H_2O molecules on the membrane surface. This water is trapped by glycerol but as the glycerol is not present as a film, some water molecules crystallize. Water crystals further increase the distance between free glycerol molecules and the cell membrane, which fosters further water crystal formation and subsequent cellular damage. Even after considerable efforts to find a filmogen cryoprotectant capable of protecting the complete cell surface and trapping all the water molecules diffusing from inside the cell, no safe filmogen cryoprotectant has yet been discovered.

It has been found by the inventors that a filmogen glycerol remaining in close contact with the cell membranes can better preserve the live cells compared to glycerol alone. The above-described preparation can thus further be used for protecting, transporting, storing or freezing cells, tissues or organs. In one embodiment the net concentration of filmogen glycerol in the sample varies between 2 and 50% (v/v), preferably between 10 and 30% (v/v) and particularly between 15 and 20% (v/v). Filmogen glycerol therefore constitutes an excellent solution to overcome this difficulty and to prevent water crystal damage to the cells.

In one embodiment of present invention the glycerol content in the preparation is comprised between 30% and 99.99% (v/v). The % of glycerol in the preparation for topical application may vary according to the part of the body where product is applied, for example a thicker product for application on open chronic wounds, a less thick product for application in the vaginal cavity or a much thinner preparation for application in the nasal or oral cavity. The percentage of glycerol in the preparation can vary between 30 and 99.99% (v/v), for example

between 90 and 99% (v/v) for vaginal application, between 70 and 99.9% (v/v) for application on skin wounds, between 30 and 60% (v/v) for application on sensitive mucosa such as the nasal mucosa.

In another embodiment the preparation further comprises an active ingredient. The active ingredient can be selected from a drug, an antibiotic, an antiseptic, a nutrient, an antibody, a protein, a growth factor, or any other substance requiring being in contact with the injured surface onto which the glycerol film is applied.

The preparation can be filled into tubes, plastic containers, syringes, ampoules, sprays, metallic containers, in volumes between 1 and 500ml depending upon the type of containers. Filmogen glycerol can also be incorporated in cotton, polymer, plastic, cellulose or other type of dressings commonly used for application on the wounds and injuries.

Present invention also relates to a method of enhancing the retention time of a glycerol film by a biological surface by preparing a solution of glycerol and plant tannins having the capacity to bind to glycerol molecules, and applying the solution onto the biological surface.

The concentration of tannin-rich plant extracts in glycerol may vary depending upon the initial concentration and composition of the tannins used to obtain the filmogen effect.

The inventors have made the following hypothesis regarding the working mechanism of the preparation. An osmotically active solution can be applied on biological surfaces where cell plasma membranes are exposed to the external environment (skin injuries where skin keratinocytes are damaged and the underlying cells are exposed, mucous membranes such as the throat, and the oral, nasal and vaginal cavities) so as to form an osmotically active film over the biological membrane and create an outward flow of hypotonic liquid. The outward flow of liquid should detach and drain impurities such as dead cells, cell membranes, dust particles, bacteria, virus particles, free-floating protein molecules such as proteases, etc..., resulting in the cleaning of the injury and mucous membrane. This mechanical mode of action produces antibacterial, anti-viral, antiseptic, cleaning and hydrating effects, which are essential to promote cell growth and healing. Sea water, containing 3-3.4% NaCl (salt), is commonly used to clean injuries or for gargling, but is not very effective because the outward flow of hypotonic liquid instantly dilutes and removes the osmotic film, limiting the duration of action of the saline solution to only a few minutes. The shorter the duration of retention of hypertonic film by the biological surface, the lesser its cleaning efficacy.

Glycerol is much more viscous than seawater or a 3% saline solution and remains over the biological membrane for a relatively longer period than seawater. As glycerol is a non-toxic,

non-irritant, totally safe, and inexpensive product for topical application as an antiseptic, antiviral, cleaning and hydrating agent, it should have been widely used to treat topical infections, clean wounds and promote wound healing. But this is not the case because glycerol is also diluted by the outward flow of hypotonic liquid it generates through its very osmotic activity, and is consequently removed from the surface only a few minutes after its application, which considerably shortens the duration of glycerol's action, and does not allow sufficient time for thorough surface cleaning. This explains why the use of glycerol alone for cleaning mucous or injured surfaces is not satisfactory.

The three hydroxyl groups of glycerol render it easily soluble in water through the formation of hydrogen bonds with water. Diluted glycerol is immediately eliminated with the hypotonic liquid flow, which progressively but rapidly (within 5-10 minutes) diminishes the osmotic effect of glycerol. The only solution to overcome this problem would be to keep reapplying the product repeatedly, every 10-15 minutes, to reconstitute the osmotically active film, which is not practical.

Therefore, the best solution involves improving the film retention duration of glycerol without altering the osmotic properties or the safety profile of the product, so as to provide an effective, safe, and inexpensive method for cleaning biological surfaces.

As glycerol acts on the biological surface exclusively through its mechanical properties, without any biological, pharmacological, metabolic or immunological interaction with the underlying live biological membranes or cells, it is important that the substance that is chosen for its capacity to improve the filmogenic properties of glycerol be similar or inert.

Present invention also relates to a method of treating skin and mucosa infections comprising the step of applying a preparation as described above on the affected area. In present application the term skin refers to skin of all areas of the body, also including, for example, the very sensitive skin on the lips. The present preparation can equally be applied onto the skin and the mucous membranes such as the oral cavity, throat, nostrils, nasal sinuses, damaged skin and tissues on the surface of the body, vaginal cavity and other natural openings of the body. Skin and mucosa infections signify the presence of any undesirable pathogen or material on the surface of the skin or mucosa, interfering with normal cell functions or with the healing process.

Present invention also relates to a method of preparing filmogen glycerol comprising mixing glycerol or a polyol solution with glycerol-binding plant tannins. In one embodiment the plant tannins can be added as a powder or a liquid.

Present invention is furthermore illustrated by, but not limited to the content of, the following examples.

EXAMPLES

Example 1: Preparation of tannin-rich plant extracts

Initially, 186 tannin-rich plant substances were selected for the preparation of proanthocyanidin (PCD)-rich, dry plant extracts.

The PCD-rich plant extracts were prepared from different plant materials rich in tannins such as fruits, seeds, skins, flesh of vegetables, nuts, tree barks, and any other tannin-rich plant material. The raw material was used either as is (wet) but might also have been presorted by drying, separating and removing the components low in tannins.

Tannin-rich plant extracts were prepared using standard methods described in the literature (Ajila CM. Crit Rev Biotechno, 31 (3) 227-249, 2011) and known to the man of art. In short, during the initial phase, an aqueous mixture of solid plant material containing proanthocyanidins was prepared by heating approximately 4kg of solid plant material with 24-40 liters of deionized water (ratio of solid material to water being 1:6 to 1:10), optionally under increased pressure (60-100 psi pressure) and at a temperature between 180 & 250°C, for a period ranging between 30 minutes and 5 hours, depending upon the rigidity of the plant material processed. After heating, the liquid extract was separated from larger debris by passing the mixture through a cotton bandage cloth. The separated solids were discarded and the PCD-rich liquid was collected. The extract was then dried by heating (180-200°C) or by atomization and used as PCD-rich extract for various experiments as well as for incorporation into glycerol.

The proanthocyanidin content in the extract was determined by the Acid Butanol assay according to the method of Porter *et al.* (Porter *et al.* Phytochemistry, 1986). In short, 200 µg dried plant extract was diluted with 300 µl of 70% acetone and the solution was pipetted into a 100 x 12 mm test tube. 3.0 ml of butanol –HCL reagent (95:5) and 0.1 ml of 2% ferric acid prepared in HCl 2N were added. The tube was vortexed and then the mouth of the tube was covered with a glass marble and put in the heating block at 97 to 100°C for 60 minutes. The tube was then allowed to cool down, and absorbance was recorded at 550 nm. The formula for calculating the percentage of condensed tannins as leucoanthocyanidin equivalent is: (absorbance 550 nm x 78.26 x dilution factor)/(% dry matter).

Only those plant extracts (42 out of the 186 tested) having a Porter value above 200 and indicating a high concentration of PCDs were used for further testing. The extracts were not purified to concentrate a specific type of tannin as best results were obtained with a mixture of PCDs and not with a particular type of tannin. Dried plant extracts mainly contain dimers, trimers and pentamers catechin building blocks.

Example 2: Preparation of filmogen glycerol

According to the type of glycerol film required for topical application, 0.1 to 8.0% PCD-containing dry powder was incorporated into glycerol and thoroughly mixed for 6h at 37°C under agitation to obtain a homogenous solution. Glycerol of vegetable origin can be purchased from suppliers such as Interchimie in France. The preparation was filled into tubes, plastic containers, syringes, ampoules, sprays, metallic containers, in volumes between 1 and 500ml depending upon the type of containers and the desired use.

Example 3 (a): Pharmacological studies: Measurement of film retention capacity of glycerol alone compared to glycerol containing different plant tannins

Experiments were conducted to study the effects of a new glycerol film containing PCD-rich plant extracts (filmogen glycerol) as compared to a non-PCD glycerol film (normal glycerol) under identical conditions. The aim of this study was to select those individual PCDs, or their associations, which improve the retention of glycerol film by the biological membrane.

Test Model:

In the absence of any specific *in vivo* model to study the duration of the film retention by a biological surface, an *in vitro* model of human multilayered epidermis was used to evaluate the effects of the addition of non-cytotoxic concentrations of different PCD-rich plant extracts, either singly or in different associations, on glycerol film retention. Human epidermis was grown on a permeable polycarbonate filter (1 cm diameter) and was kept on a sponge soaked with culture medium, its outer surface remaining in contact with air, as is the case *in vivo*. Through capillary action, the culture medium diffuses through the polycarbonate filter and supplies nourishment to the epidermal cells to keep those cells alive.

Inserting one or two additional polycarbonate filters increases the distance between the culture medium and the cells; the amount of available medium, which reaches the cells, then decreases, and in absence of nutrients and hydration, the cells die. Cell death can be measured by vital MTT staining (Ferrari MJ. J Immunol methods 13 (2), 165-172, 1990). The percentage of

live cells is proportional to the duration of retention of the glycerol film by the epidermal surface.

Test products:

Various glycerol preparations containing test products (mainly PCD-rich plant extracts), at concentrations varying between 0.1 and 5.0%. Plant extracts were added to the film substance to study their effect on the film's cell-adhesive properties.

Quantity of test product applied per epidermis: 20 µl

Method of exposure:

Glycerol preparations were directly applied on the epidermis as thin layer with the help of a pipette (n=6 per concentration): the epidermis was placed on two filters and the test product was applied on the epidermis surface. The filters were kept on a sponge, which was inserted in a petri dish containing an appropriate quantity of medium to nourish the cells. During the experimental period, the cell culture filter was gently removed at 6h, 24h and 48h, and stirred in a serum-free medium for a 20-second period to allow product film detachment (when the film or the film ingredients were not well adhered to the epidermal surface). Absence of osmotic film on the epidermis minimizes liquid culture medium supply to the cells and causes cell death. According to the initial results obtained for each test product concentration in glycerol, the concentration of plant tannins was either increased or decreased to obtain maximum filmogen effects.

Exposure conditions: 37°C, 5% CO_2 for 72 hours.

Cell viability measurements:

MTT coloration and histological analyses. The cell viability was scored as follows:

Score 4: 100% cells (compared to the controls) with intense blue color.

3: Approximately 75% live cells with dark blue color.

2: Approximately 50% live cells with medium blue color.

1: Approximately 25% live cells with light blue color.

0: No live cells, whitish epidermis color.

During each experiment, the scores obtained for 6 epidermises at each time point were averaged to determine cell survival. The mean scores of 3 individual experiments were then averaged to calculate mean cell survival percentage as compared to cells treated with glycerol alone.

Controls:

Positive controls: No test product but the same test conditions as for the test products. Under these conditions nearly 95-100% cells die within 72h.

Glycerol control: Identical to the positive controls with the exception that glycerol, free of any PCD extract, was applied on the culture surface. Under these conditions nearly 60-70% cells die within 72h due to poor nutrient supply.

Results:

The cell survival % after 72h was as follows:

Positive controls: 6.32 (± 2.4) %

Glycerol alone: 23.85 (± 4.8) % indicating 17.53% higher cell survival compared to the positive controls. This shows that glycerol exerts osmotic effects to continue nourishing and hydrating the cells.

Filmogen glycerol: When PCD-rich plant extracts or synthetic polymers were added to the glycerol at concentrations between 0.1 and 5.0%, cell survival was affected as follows:

Very high glycerol film retention capacity (+ 200 to + 300 % live cells compared to glycerol alone):

PCDs from: (1) *Vaccinium myrtillus* alone, and (2) association of PCD-rich plant tannins of *Vaccinium myrtillus* (fruit extract) + *Vaccinium macrocarpon* (fruit extract); *Vitis vinifera* (seed extract) + *European elder* (fruit extract); *Camellia sinensis* (leaf extract) + *V. myrtillus; V. myrtillus + E. elder; C. sinensis + V. vinifera + E. elder; V. Vinifera + E. elder + Glycine max* (seed extract); *V. macrocarpon + C. sinensis + V. vinifera*; and *V. macrocarpon + C. sinensis + V. myrtillus + V. vinifera*.

High film retention capacity (+ 100 to + 199 % live cells compared to glycerol alone):

PCDs from: (1) Acacia catechu (bark and whole plant), *Tenacetum parthenium* (flowers and leaves); *Salix alba* (whole plant); *Salvia officinalis; Rosmarinus officinalis; V. macrocarpon; V. vinifera; C. sinensis; E. elder; Opunitia Sp.* (fruits), *singly, and (2) associations of Fraxinus chinensis + Gingko biloba; Fraxinus chinensis + Gingko biloba + Camellia sinensis; V. vinifera + Ribes nigrum*.

Moderate film retention capacity (+ 10 to + 99 % live cells compared to glycerol alone):

Morus alba (fruits); *Rubus sp.* (fruits); *Quercus sp.* (fruits, bark), *Pinus sp.* (bark, fruit).

Moderate filmogen activity was also obtained with synthetic polymers such as syntan containing polymers (example Blancotan SH2 and Ledosol CRP which can be purchased from

Silvateam s.p.a., Italy) or polymeric resins (such as Aritan A7, an anionic nitrogen containing polymeric resin which can be purchased from Arihant Dyechem company in India).

Conclusion:

These results prove that many different tannins, but especially dimer to pentamer catechins, natural or synthetic, are capable of producing filmogen glycerol by binding with the glycerol molecules and are capable of improving the mechanical properties of the glycerol film over the biological surface.

In order to measure the filmogen quality of the preparations as prepared in example 2, tests were conducted, showing in an indirect manner that the filmogen quality of glycerol has been increased.

Example 3(b): Pharmacological studies: Measurement of solubility of glycerol alone compared to filmogen glycerol *in vitro*

To verify the effect of the addition of tannins on glycerol's mechanical resistance to solubility in the water attracted through its own osmotic activity, we proceeded to thermogravimetric analysis (TGA) of glycerol alone versus filmogen glycerol (containing 1% tannin-rich plant extract). A film of the respective test substances was exposed to a constant temperature (30°C) & relative humidity (20%) atmosphere and time-related mass increase was measured. Water solubility could thus be quantified (Fig. 1).

Preliminary results show that the tannin decreases glycerol's solubility in water. The reduced solubility is supposedly imputable to the tannin occupying some of glycerol's hydroxyl groups, which are therefore not available to bind with the water molecules.

Example 3(c): Pharmacological studies: Measurement of film retention duration of glycerol alone compared to filmogen glycerol in diabetic ulcers

Filmogen capacity of glycerol *in vivo*: The experiments were conducted in patients having diabetic ulcers covering a surface area of approximately 4 (± 1.5) cm^2. 2ml of glycerol (Group 1, n=6 ulcers) or 2ml of filmogen glycerol (Group 2, n=6 ulcers) was applied on the wound surface and the wounds were kept in a vertical position after application. Samples of wound fluid (100µl) were collected at hourly intervals over a 6h period, and the quantity of glycerol was measured.

The following results were obtained (see Fig. 2).

Results showed that under the experimental conditions of this study, nearly 92% of the normal glycerol was eliminated within 1 hour and 100% within 2 hours, compared to only 34% and

56% reduction for the filmogen glycerol. The activity of the filmogen glycerol lasted for 6 hours.

Example 4: Results of the measurements of tannin - glycerol binding and production of filmogen glycerol

As shown in the pharmacological study in example 3, among 42 tannin-rich plant extracts mixed with glycerol in different concentrations, either singly or in various associations, the following plant tannins (PCDs) showed different degrees of filmogenic qualities:

Very High filmogenic quality: 6 plant extracts were classified as very highly active: *V. myrtillus, V. macrocarpon, V. vinifera, E. elder, C. sinensis* and *G. max* as they increased the film retention duration between 200 and 300% compared to glycerol alone. Very high quality of glycerol film was obtained with: (1) the PCDs from *Vaccinium myrtillus* alone, as well as associations of PCD-rich plant tannins of (2) *Vaccinium myrtillus* (fruit extract) + *Vaccinium macrocarpon* (fruit extract); (3) *Vitis vinifera* (seed extract) + European elder (fruit extract); (4) *Camellia sinensis* (leaf extract) + *V. myrtillus*; (5) *V. myrtillus* + E. elder; (6) *C. sinensis* + *V. vinifera* + E. elder; (7) *V. Vinifera* + E. elder + *Glycine max* (seed extract); (8) *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. vinifera*; and (9) *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. myrtillus* + *V. vinifera*.

High filmogenic quality: 9 plant extracts were classified as highly active as they increased the film retention duration between 100 and 200% compared to glycerol alone: *Acacia catechu* (bark and whole plant), *Tenacetum parthenium* (flowers and leaves); *Salix alba* (whole plant); *Salvia officinalis*; *Rosmarinus officinalis*; *Fraxinus chinensis, Gingko biloba*; *Ribes nigrum* (fruit), and *Opunitia Sp.* (fruits) as well as synthetic polymers such as Aritan-A7, Ledosol CRP, and Blancotan SH2

Moderate filmogenic quality: 4 plant extracts were classified as moderately active as they increased the film retention duration between 10 and 99 % compared to glycerol alone: *Morus alba* (fruits); *Rubus sp.* (fruits); *Quercus sp* (fruits, bark), *Pinus sp* (bark, fruit).

These results indicate that: 1. Tannins bind to glycerol; 2. Some plant tannins bind very strongly with the glycerol molecule, while others bind with a lesser strength. This shows that glycerol's binding with tannins is specific; 3. The binding of tannins to glycerol starts as soon as tannins are added to the glycerol; 4. Tannin dimers, trimers and pentamers show a stronger binding and filmogen effect, compared to polymers or big condensed tannins. This may be related to the fact that smaller tannin molecules have multiple possibilities to bind with glycerol. Nearly 50% PCD – glycerol binding occurs when both ingredients are mixed and stored, and the remaining 50% when the solution is applied as a thin film over the skin or

mucosal surface. Synthetic polymers can also bind to glycerol molecules and improve the film retention duration of the glycerol film.

Based on these findings, the filmogen glycerol can be prepared by mixing glycerol or any other polyol solution with glycerol-binding plant PCDs.

Example 5: Examples of preparations for treatment of skin and mucosa infections

Different filmogen glycerol preparations were prepared as detailed in Example 2. The percentages indicate the wt/wt of the dry PCD-rich plant extract.

1. Glycerol - 69.22%, *V. macrocarpon* extract - 0.18%, *V. myrtillus* extract – 0.18%; Excipients: Honey - 29.0%, Aqua - 1.42% filled in 10ml tubes to treat traumatic oral ulcers.
2. Glycerol – 72.92%, *V. macrocarpon* extract - 0.30%, *V. myrtillus* extract - 0.36%; Excipients: Honey - 12.0%, Aqua - 14.42% filled in 20ml spray for the treatment of oral mucositis.
3. Glycerol – 74.265%, *V. vinifera* seed extract - 0.48%, *S. nigra* (E. elder) fruit extract - 0.32%; Excipients: Honey - 12.0%, Aqua – 12.935% filled in 30ml sprays for throat application.
4. Glycerol – 73.94%, *V. vinifera* seed extract - 0.48%, *S. nigra* (E. elder) fruit extract - 0.32%, *Glycine max* seed extract 0.07; Excipients: Honey - 12.0%, Aqua – 13.19%, filled in 20ml sprays for throat application in children.
5. Glycerol – 32.488%, *V. macrocarpon* extract - 0.12%, *V. myrtillus* extract - 0.12%, *C. sinensis* extract - 0.22%, *S. nigra* (E. elder) fruit extract - 0.10%; Excipients: Aqua – 66.952%, filled in 15ml plastic sprays for the treatment of rhinosinusitis.
6. Glycerol – 68.66%, *V. myrtillus* extract - 0.18%, *C. sinensis* extract - 0.30%, Excipients: Honey - 29.0%, Aqua - 1.76%, Xanthan gum 0.1%, filled in 50ml tubes for topical application on bedsore.
7. Glycerol – 99.16%, *V. myrtillus* extract - 0.18%, Citric acid qsp pH 4.5; Excipients: Aqua – 0.66%, filled in 10ml tubes with a canula for the treatment of vaginal dryness and infection.
8. Glycerol – 72.06%, *V. vinifera* seed extract - 0.18%. Excipients: Honey 27.0%, Aqua – 0.66%. Xanthan gum 0.10%, filled in 100ml tubes for topical application on skin injuries.
9. Glycerol – 76.166%, *C. sinensis* extract - 0.24%, *V. vinifera* seed extract - 0.36%, *S. nigra* (E. elder) fruit extract - 0.20%. Excipients: Honey - 20.0%, Aqua – 2.934%, Xanthan gum

0.10%, filled in 6ml PET tubes for topical application on the lesions of cold sores (Labial herpes).

10. Glycerol – 97.48%, *V. macrocarpon* extract - 0.18%, *S. nigra* (E. elder) fruit extract - 0.36%, Citric acid qsp pH 4.5; Excipients: Aqua - 1.98%, filled in 10ml tubes with a canula for vaginal application to treat genital herpes and bacterial vaginosis.
11. Glycerol – 76.42%, *V. macrocarpon* extract - 0.12%, *C. sinensis* extract - 0.48%, *V. vinifera* seed extract - 0.36%; Excipients: Honey - 19.0%, Aqua – 3.52%, filled in 50ml tubes for topical application on the lesions of psoriasis, eczema and dermatitis.
12. Sorbitol – 94.7%, *V. macrocarpon* extract - 2.1%, *Acacia catechu* 3.2%, filled in 20ml tubes for topical application on venous leg ulcers.
13. Glycerol – 90.60%, *V. macrocarpon* extract - 1.30%, *Salix alba* – 5.0%; Excipients: Aqua – 3.10%, filled in 50 ml tubes for topical application on diabetic ulcers.
14. Sorbitol – 74.265%, *V. vinifera* seed extract - 0.48%, *S. nigra* (E. elder) fruit extract - 0.32%; Excipients: Honey - 12.0%, Aqua – 12.935%, filled in plastic 100ml containers for topical application on skin burns.
15. Sorbitol – 73.94%, *V. vinifera* seed extract - 0.48%, *S. nigra* (E. elder) fruit extract - 0.32%, *Glycine max* seed extract 0.07; Excipients: Honey - 12.0%, Aqua – 13.19%, filled in 10ml syringes for topical application on chronic wounds.
16. Sorbitol – 32.488%, *V. macrocarpon* extract - 0.12%, *V. myrtillus* extract - 0.12%, *C. sinensis* extract - 0.22%, *S. nigra* (E. elder) fruit extract - 0.10%; Excipients: Aqua – 66.952%, filled in 50ml sprays for throat application to treat the flu.
17. Xylitol– 68.66%, *V. myrtillus* extract - 0.18%, *C. sinensis* extract - 0.30%, Excipients: Honey - 29.0%, Aqua - 1.76%, Xanthan gum 0.1%, filled in 100ml tubes for the treatment of chronic dry ulcers.
18. Glycerol – 95%, *V. myrtillus* extract - 5.0%, Citric acid qsp pH 4.5, filled in 4ml ovules for vaginal introduction to treat bacterial vaginosis.
19. Glycerol – 50%, Xylitol – 20%, *V. vinifera* seed extract - 1.0%. Excipients: Honey 28.8%, Xanthan gum 0.20%, used to soak polyester bandages for application on chronic wounds.
20. 1g of plant tannin preparation containing 400mg extract of *V. vinifera*, 350 mg *V. macrocarpon*, 100mg *V. myrtillus* and 150mg powdered rice starch sprinkled on a 4x5 cm cotton gauze. First pure glycerol is applied on the injured surface (6ml on 10 cm^2 surface of a chronic sore) and the wound surface is ~~closed~~ covered with the bandage, the sprinkled tannin part being directed towards the wound surface.

21. 5x5 cm cotton non-adhesive gauze-type dressings soaked in a solution containing glycerol (82%), 0.5% plant extract of *S. nigra* (E. elder) and 17.5% % honey and packed in aluminum bags. The gauze is directly applied topically on the injured surface.

22. Glycerol – 76.0%, *C. sinensis* extract - 0.5%, *V. vinifera* seed extract - 0.5%, *S. nigra* (E. elder) fruit extract - 0.5%. Excipients: Honey - 22.5% mixed in a hydrogel and fixed on a cross-linked polymer surface (10g per 10 cm^2 polymer surface) for topical application on bedsores, diabetic ulcers and venous leg ulcers.

23. Glycerol – 97.48%, *V. macrocarpon* extract - 2.10%, *S. nigra* (E. elder) fruit extract - 0.42%, adsorbed on a flexible zinc oxide nanocomposite bandage as a wound healing dressing for chronic bedsores and diabetic ulcers.

24. Glycerol – 68.66%, Aritan-A7 - 0.18%, *Fraxinus chinensis* - 0.30%, Excipients: Honey - 29.0%, Aqua - 1.76%, Xanthan gum 0.1%, filled in 50 ml tubes for topical application on bedsores.

25. Glycerol – 99.16%, *R. nigrum* extract - 0.18%, Citric acid qsp pH 4.5; Excipients: Aqua – 0.66%, filled in 10 ml tubes with a canula for the treatment of vaginal dryness and infection.

26. Glycerol – 72.06%, *G. biloba root* extract - 0.18%, Blancotan SH2 0.20%, Excipients: Honey 27.0%, Aqua – 0.46%. Xanthan gum 0.10%, filled in 100 ml tubes for topical application on skin injuries.

27. Glycerol 99.5%, Ledosol CRP powder 0.5%, filled in 50ml jars for topical application on psoriasis, eczema and dermatitis skin lesions.

28. Glycerol 30%, Honey 69.5%, dried extract of Fraxinus chinensis 0.50%, filled in 50ml containers for topical application on the throat surface to treat viral throat and sinus infections.

Example 6: Cryopreservation experiments; comparative study on glycerol versus filmogen glycerol

The aim of this study was to compare the protective effects of glycerol alone or in association with tannins or polymers capable of forming a glycerol film over the live tissue surface, and to evaluate the effects obtained on cell survival.

Live cells and tissues used:

Primary cultures of vascular human smooth muscle cells (SMCs), skin fibroblasts, rat kidney epithelial cells, MDBK and MDCK cell lines were grown in 25cm^2 plastic tissue culture flasks. Cells were dispersed with trypsin – EDTA solution, washed with medium, and a cell suspension containing 1x10^{7}cells/ml was prepared. Suspensions of human blood lymphocytes were also prepared as samples of non-adherent cells. Similarly, fresh live human skin samples collected for hospitals were cut into 1 cm^2 pieces and two pieces of each skin sample were cryopreserved in different mediums as given below.

Four freezing mediums were prepared in DMEM (Dubelco's Minimum Essential Medium) containing either: (1) 5% DMSO, 10% FCS and culture medium qsp 100ml; (2) 2% DMSO + 10% serum and culture medium qsp 100ml; (3) glycerol 20%, FCS 10%, 2% DMSO and culture medium qsp 100ml; or (4) glycerol 20% plant PCDs 1%, FCS 10%, DMSO 2% and culture medium qsp 100ml called filmogen glycerol. Mediums were stored at 2° to 8°C until use. Note that the appropriate freezing medium depends on the specific cell line.

Cell suspensions were centrifuged at approximately 100–200 × g for 5 to 10 minutes and the supernatant was decanted without disturbing the cell pellets. Cell pellets were re-suspended in cold freezing medium at densities of 1x10^8 cells per ml. Aliquots of the cell suspension were dispensed into cryogenic storage vials and frozen in a controlled-rate freezing apparatus, decreasing the temperature approximately 1°C per minute up to -70°C. Tissue and cell culture vials were then transferred to liquid nitrogen containers (-196°C) and kept for a 6-month period. The same technique was followed for the skin grafts.

For thawing, ampoules were removed and left at room temperature for approx. 1 minute and then transferred to a water bath at 37°C for 2-3 minutes until fully thawed. Ampoules were wiped in 70% alcohol prior to opening in a sterile environment. Cells were diluted in 10 ml DMEM containing 5% FCS, centrifuged, pelletted, re-diluted in culture medium and the number of live cells was determined using trypan blue and MTT stains.

The skin grafts processed in a similar fashion except that the grafts were cut into 5 slices, introduced in 25 cm^2 tissue culture flasks containing 15 ml cell growth medium with 10% FCS and grown for a period of 10 days. After 10 days of culture, the growing graft cells were dispersed with trypsin – EDTA solution, a cell suspension was prepared and the number of live cells was counted.

Results:

Mean number of live cell culture cells: (1) 5% DMSO, 10% FCS in culture medium = 65.2%; (2) 2% DMSO + 10% serum in culture medium = 62.6%; (3) 20% glycerol, 10% FCS and 2% DMSO in

culture medium = 68.4%; and (4) 20% glycerol containing 1% plant PCDs, 10% FCS, 2% DMSO in culture medium called filmogen glycerol = 91%.

Mean number of live skin graft cells: (1) 5% DMSO, 10% FCS in culture medium = 51.1%; (2) 2% DMSO + 10% serum in culture medium = 54.9%; (3) 20% glycerol, 10% FCS and 2% DMSO in culture medium = 63.3%; and (4) 20% glycerol, 1% plant PCDs from *V. macrocarpon* (0.5%) and *R. Nigrum* (0.5%), 10% FCS, 2% DMSO in culture medium called filmogen glycerol = 83.8 %.

Conclusion: Filmogen glycerol is much more efficient, compared to glycerol alone, for cryopreservation of individual dispersed cells and tissue grafts.

Example 7: Examples of cryopreservative filmogen glycerol

Different preparations were prepared as detailed in Example 2. The percentages indicate the wt/wt of the dry PCD-rich plant extract.

1. Glycerol 20%, Plant PCDs of *V. myrtillus* 0.5%, *A. catachu* 0.4%, and *S. alba* 0.1%; DMSO 5.0%, fetal bovine serum 20%, culture medium qsp 100ml used to store dispersed live cells.
2. Glycerol 20%, Plant PCDs 1% (of *V. macrocarpon* 0.5% and *R. nigrum* 0.5%), FCS 10%, DMSO 2.0% in culture medium qsp 100%.
3. Glycerol 10%, Plant PCDs of *V. vinifera* seeds 1.0% and E. elder 0.5% , DMSO 2.0%, fetal bovine serum 10%, culture medium qsp 100ml, used to store skin grafts before grafting and transport.

Example 8: *In vitro* osmotic properties of glycerol alone compared to glycerol containing 1% association of plant PCDs as per the preparation n°2 in example 5 (code – Orosol)

In the absence of *in vivo* models to mimic the osmotic exudation of hypotonic liquid from the oral or vaginal mucosa, a cell culture model of human epidermis was used which contains normal human epithelial cells grown on a polycarbonate filter in an air/liquid phase. Under optimal conditions, a multilayered cell culture, equivalent to the mucosal surface is obtained on a polycarbonate support. This support is placed on a sponge in contact with a defined amount of culture medium. The medium diffuses into the sponge and the filter, and supplies nutrients as well as hydration to the cells. Under these conditions, the cell culture can be kept alive for at least a week.

To create an experimental model of mucosa dryness, we inserted one or two extra filters between the cells and the sponge, thereby reducing the amount of liquid medium available to

the cells. In absence of hydration, cells die, and the cell mortality can be measured with a vital dye MTT. Cell mortality is proportional to the culture surface's dryness.

If an osmotically active, hypertonic solution is applied on the epidermal surface exposed to dryness, the culture medium is attracted towards to epidermis due to osmosis and increases the amount of medium available to the cells. Cell survival is therefore proportional to the extent of osmosis and cellular hydration.

The aim of this study was to evaluate the hydrating properties of filmogen glycerol compared to regular glycerol. The product was applied on the surface of the normal (no filter), slightly dehydrated (1 filter) or severely dehydrated (2 extra filters) epidermis (20 µl), and cells were incubated at 37°C-5% CO_2 for one week. Each epidermis was washed by stirring the culture in culture medium for 20 seconds on days 1, 3 and 5, and cell viability was measured on day 7 using MTT staining.

Mean score of cell survival after 1-week culture was as follows:

1. Normally humidified cultures (no filter): 100%
2. Partially dehydrated controls without product: 43.11%
3. Severely dehydrated cultures without product: 11.57%
4. Partially dehydrated cultures with glycerol: 62.3%
5. Severely dehydrated cultures with glycerol: 43.15%
6. Partially dehydrated cultures with filmogen glycerol: 89.46%
7. Severely dehydrated cultures with filmogen glycerol: 77.89%

Conclusion: Filmogen glycerol remains on the surface of the epidermis over a longer period of time compared to normal glycerol, with higher osmotic effects, and protects the cells against dehydration.

Example 9: *In vivo* rat wound healing properties of filmogen compared to normal glycerol

Methods of experimental lesion induction:

The rat dorsal skin was shaved and 3 circular lesions, 0.8 mm in diameter and depth, were made to the hypodermis with a dermatome. 0.2 ml of each test product was applied on each lesion for 7 consecutive days. Lesion diameter was measured every day and mean values were compared.

Test product:

Group 1: Distilled water; Group 2 : Glycerol alone; Group 3: Filmogen glycerol as per the example N° 6. (10 rats in each group).

Results:

Mean lesion size (diameter / day / lesion during 7 days) in distilled water group = 3.32 cm^2; in glycerol group = 2.95 cm^2 and in the filmogen glycerol group = 2.03 cm^2.

Conclusion:

Although glycerol alone does accelerate healing, the healing rate was much faster with the application of filmogen glycerol.

Stability of the glycerol and tannin preparations:

Studies were conducted to evaluate the stability of preparations cited in the examples over 36 months of storage at 30ºC ± 2ºC and at 40ºC ± 2ºC. The preparations were stable for a minimum period of 36 months.

Contents–container interactions:

Preparations cited in the examples were filled into plastic (PE, PET) tubes and aluminum containers and the contents were analyzed at regular intervals to evaluate any interaction between the contents and the containers. Infrared spectrophotometry analyses of samples just after preparation and after 12 months of storage at 37°C indicated the absence of any interaction between the contents and the containers.

In-use stability:

Samples of the compositions cited in the examples were studied for decomposition or contamination during in-use period. The results obtained validated the product in-use stability for a period of 1-3 months.

Cytotoxicity:

The cytotoxicity of filmogen glycerol, evaluated according to NF-ISO 10993 guidelines showed that the product is not cytotoxic up to a concentration of 5% in the culture medium of L929 cells.

Hypersensitivity:

This study was conducted in accordance with the requirements of the FDA Good Laboratory Practice (GLP) Regulations (21 CFR, Part 58, April 1st, 2005) and the OECD Good Laboratory Practices, reference ENV/MC/CHEM (98) 17 adopted by decision of the Council of November 26, 1997 using examples of the preparations N° 2, 3, and 5.

The product was injected intra-dermally, as well as applied topically directly on the shaved G. pig skin with a patch, to evaluate local reaction and delayed hypersensitivity. For comparison, an identical negative control test was performed with 0.9% NaCl solution by injecting the

solution intra-dermally and by topical application. The products sensitized the skin by intradermal injection but topical application did not induce sensitization.

Oral toxicity *in vivo*:

The samples of filmogen glycerol as per the example N° 2, 7, 8 and 20 were administered to rats at a dose of 5g/kg body weight. The study was conducted according to GLP norms. In the absence of any abnormality, the acute lethal dose was estimated above 5g/kg for all the products tested.

Topical irritation:

The studies were performed using examples of the test product composition N° 2, 7, 9, 10 and 12 as per the protocols for skin and *in vitro* BCOP eye irritation tests published in the official journal of French Republic of 21st February 1982. The primary cutaneous irritation index was below 0.50 and the products were classified as non-irritant to the skin. The mean Bovine Corneal Opacity Index was between 10 and 25 for all the products and therefore the products were classified as slightly irritant to the eyes.

Example 11: Clinical efficacy

Different preparations were prepared as per the examples of compositions given in the text and the clinical efficacy of the compositions was evaluated in patients suffering from skin or mucosa pathologies. The summaries of the studies are given below.

Study 1: Therapeutic efficacy of glycerol alone versus filmogen (Preparation N° 11 of Example 5 called VB-DERM) for the treatment of psoriasis, eczema and dermatitis.

A 6-week long, single blind trial on 107 patients suffering from skin lesions of Psoriasis, Eczema & Dermatitis (PED) was performed, in which the clinical efficacy of composition as per the preparation N° 11 as per Example 5 was compared with glycerol alone for the treatment of skin lesions due to Psoriasis, Eczema or Dermatitis (PED). 56 patients were treated with filmogen glycerol preparation VB-DERM (filmogen glycerol group) and 51 with glycerol alone (control group). The product was applied topically, twice daily for a period of 6 weeks. Lesions were rated on a scale of 0 to 4 on weeks 0, 1, 2, 4 and 6.

All throughout the study, very positive results of filmogen glycerol preparation (VB-DERM) efficacy on Psoriasis, Eczema, and Dermatitis have been observed.

Analyzing the scores recorded at regular time intervals over a 6-week span clearly proved that filmogen glycerol is much more effective for the treatment of PED lesions compared to glycerol alone (Figs. 3, 4 and 6). The wound cleaning and healing efficacy of filmogen glycerol was

statistically significant ($p<0.005$) in treating all symptoms associated with those diseases: erythema & pruritis, oedema, dryness, oozing, scaling & crusting, and itching. The quality of life as assessed by the investigators and the patients, right from the second week after the start of treatment, was also significantly improved (Fig.5).

These results indicate that filmogen glycerol remains on the surface of the PED lesions for a much longer period of time thereby keeping the injury clean of all the free contaminants (dead cells, cell debris, proteolytic enzymes, MMPs, cytokines, interleukines, interferons, viruses, bacteria, dust particles) and restoring normal skin cell production. Filmogen glycerol is thus much more highly active compared to non-filmogen glycerol for the treatment of skin diseases involving excessive skin growth, presence of contaminants in the lesions, involvement of multiple free-floating impurities such as dead cells, cytokines, MMPs, and other protein molecules at the site of injury. These contaminants are permanently removed from the lesion, creating a favorable ground for normal skin growth.

Study 2: Therapeutic efficacy of glycerol alone and filmogen glycerol (composition as per the preparation N° 10 of example 5 (HG-VB)) for the treatment of genital herpes

An open label, single-arm, prospective, multicentric, pilot study was conducted to evaluate the efficacy of filmogen glycerol (HG-VB), compared to normal standard glycerol, in women suffering from genital herpes and infection.

60 women having visible lesions of genital herpes were treated with HG-VB (10ml per day) for 14 consecutive days. Product was administered daily into the vaginal cavity and the symptoms of genital herpes were evaluated before treatment and on days 1 (2 h), 4, 7, and 14. Smears from genital lesions were also collected to evaluate the number of virus-loaded multinucleated giant cells using Tzanck test. 20 women were treated only with glycerol under identical clinical conditions.

Results: Statistically significant reduction in vaginal itching, redness, pain, dryness, discharge, presence of blisters, and normalization of vaginal pH was observed right after 2h of 1st application of HG-VB compared to the treatment with glycerol alone. The results of this study clearly proved that a filmogen glycerol continues draining hypotonic liquid from the inner parts of the vaginal cavity over a period of 6-8 hours and cleans all the contaminants, compared to glycerol alone with a shorter duration (0.5 to 1h) of action.

Study 3: Efficacy of glycerol alone and filmogen glycerol (glycerol in association with PCD-rich plant extracts as per the preparation N° 9 of example 5 (HL-VB)) in eliminating free virus particles present on the surface of labial herpes lesions

An open label, single arm, prospective, multicentric, pilot study was conducted on 60 patients having open labial herpes lesions. 30 patients were treated with normal glycerol and 30 with HL-VB by applying a few drops of the products, in each group identically, twice daily for a maximum period of 14 consecutive days. Labial lesion smears were collected and mean virus concentration was measured by quantifying the number of multinucleated virus-infected giant cells in each lesion using Tzank test, and the mean amount of free virus particles was determined in both groups.

The mean amount of free virus particles was >750, 635*(±17.51)*, 542*(±22.35.)*, and 522 *(±13.50)* in glycerol treated group compared to 465 *(±10.8)*, 359*(±6.35)*, 226*(±10.22)*, and 0.0 on days 1, 4, 7 and 14, respectively. These results indicate that HL-VB, i.e. glycerol containing PCDs or filmogen glycerol, exerts its effects over a longer period of time than glycerol alone.

Study 4: Efficacy of glycerol alone and glycerol in association with PCD-rich plant extracts, called filmogen glycerol (composition as per the preparation N° 5 of example 5 (G-PCD)), to break open the bacterial biomembrane blocking the sinus openings in patients suffering from rhino sinusitis

A 21-day controlled clinical trial of G-PCD compared to glycerol alone in patients suffering from acute symptoms of nasal sinus infection was performed.

The aim of this study was to evaluate the sinus-opening efficacy of G-PCD solution (32% glycerol, 1% plant PCDs in water) as per the example N° 5, compared to glycerol alone (32% glycerol in water). Among 127 patients suffering from acute and chronic sinusitis 109 were selected for the study. 58 patients were treated with G-PCD and 51 with glycerol. Products were administered as sprays (3 at each treatment application), 2-3 times per day for a maximum period of 21 days.

The parameters studied were: 1. Effect on nasal congestion and runny nose; 2. Effect on pain upon pressure around the nasal sinus surface; 3. Overall condition of the patient with respect to sinus infection; and 4. The influence on antibiotic therapy. Results recorded after 30 minutes, 3 days and 7 days, showed a significantly greater symptom reduction in the G-PCD group compared to glycerol group for nasal congestion (-31.02%, -57.23% and -73.79% compared to -20.40%, -19.09% and -30.25%), sinus pain (-6.91%, -79.02% and -85.18% compared to -1.69%, -8.36% and -53.36%), and overall rhinosinusitis condition (-4.15%, -

69.84% and -79.89% compared to -22.56%, +3.52% and -17.62%) (Fig.7). The intensity of runny nose was increased by as much as 164.79% in the G-PCD group compared to only 31.71% in the glycerol group within 30 minutes of first product administration. These results indicate that G-PCD exerts a very high osmotic pressure compared to glycerol under identical conditions, leading to the breakdown of the biofilm and opening of the sinuses. Only 21% patients in the G-PCD group required antibiotic therapy for an average 7.41 days compared to 40% in the glycerol group for a period of 10.5 days (Fig. 8)

These results clearly indicate that filmogen glycerol remains over the nasal mucosa surface for a longer period of time compared to the standard glycerol solution.

Study 5: Comparative film-forming and osmotic properties of glycerol alone compared to the glycerol containing 1% plant PCDs (filmogen glycerol composition as per the preparation N° 2 of example 5 (Orosol)) on oral mucositis lesions

Chemotherapy- and radiotherapy-induced oral mucositis lesions show a highly damaged oral mucosa, with infection and the presence of toxic chemicals in the lesion. This causes severe pain, burning sensation, and difficulty in eating. Among a total of 69 patients enrolled in the study, 48 were treated with the Orosol solution and 21 with glycerol as a spray. Product was applied 4-5 times per day for a period of 28 days. The grade of overall mucositis, intensity of pain and burning sensation, formation of new ulcers and effect on eating impairment were evaluated before treatment, 30 minutes after first product application and on days 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 and 28. A statistically significant difference in mucositis healing was observed in the Orosol group compared to the glycerol group (Fig. 9). The duration of Orosol activity was nearly 3 times longer compared to glycerol alone in the control group, with proportional increase in the healing effects. Filmogen glycerol attracts hypotonic liquid for a much longer period of time, cleans the lesion, and helps promote recovery.

The results of these 5 clinical studies prove that:

1. Plant PCD-containing glycerol forms a long lasting highly osmotic film over the injured surfaces and mucosa compared to glycerol alone.

2. The cleaning effects on the injured surface are directly proportional to the duration of retention of the osmotic glycerol film over the injury.

3. The osmotic exudation of hypotonic liquid eliminates all the free-floating contaminants, irrespective of the nature of the contaminant, due to the non-pharmacological but mechanical properties of the osmotically active film.

4. PCD-containing filmogen glycerol is safe and non-irritant.

CLAIMS

1. A preparation for topical application comprising glycerol and plant tannins, wherein the plant tannins have the capacity to bind to glycerol so that the glycerol has filmogen quality.

2. The preparation of claim 1, wherein the plant tannins are chosen from proanthocyanidins.

3. The preparation of claim 2, wherein the proanthocyanidins are obtained from parts of a plant, or the whole plant, the plant being selected from *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, *European elder*, *Camellia sinensis*, *Glycine max*, *Acacia catechu*, *Fraxinus chinensis*, *Gingko biloba*, *Ribes nigrum*, *Tenacetum parthenium*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Opunitia sp.*, *Morus alba*, *Rubus sp.*, *Quercus sp*, *Pinus sp.*, *Rheum emodi*, and combinations thereof.

4.The preparation of claim 2, wherein the proanthocyanidins are obtained from parts of a plant, or the whole plant, the plant being selected from *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, *European elder*, *Camellia sinensis*, *Glycine max*, and combinations thereof.

5. The preparation of claim 2, wherein the proanthocyanidins are synthesized.

6. The preparation of claims 1 to 5, wherein the glycerol content in the preparation is comprised between 30% and 99.99% (v/v).

7. The preparation of claims 1 to 6, further comprising an active ingredient.

8. The preparation of claim 7, wherein the active ingredient is selected from a drug, an antibiotic, an antiseptic, a nutrient, an antibody, a growth factor or a protein.

9. Use of a preparation of claims 1 to 8 for the treatment of skin and mucosa infections.

10. Use of a preparation of claims 1 to 8 for protecting, transporting, storing or freezing cells, tissues or organs.

11. Use of claim 10, wherein the net concentration of filmogen glycerol in the final solution varies between 2-50% (v/v), preferably between 10-30% (v/v) and more preferably between 15-20% (v/v).

12. Method of enhancing the retention time of a glycerol film by a biological surface by preparing a solution of glycerol and plant tannins having the capacity to bind to glycerol molecules and applying the solution to the biological surface.

13. Method of treating skin and mucosa infections comprising the step of applying a preparation according to any one of claims 1 to 8 on the affected area.

14. Method of preparing filmogen glycerol comprising mixing glycerol or a polyol solution with glycerol-binding plant tannins.

15. The method of claim 14, wherein the plant tannins are added as a powder or a liquid.

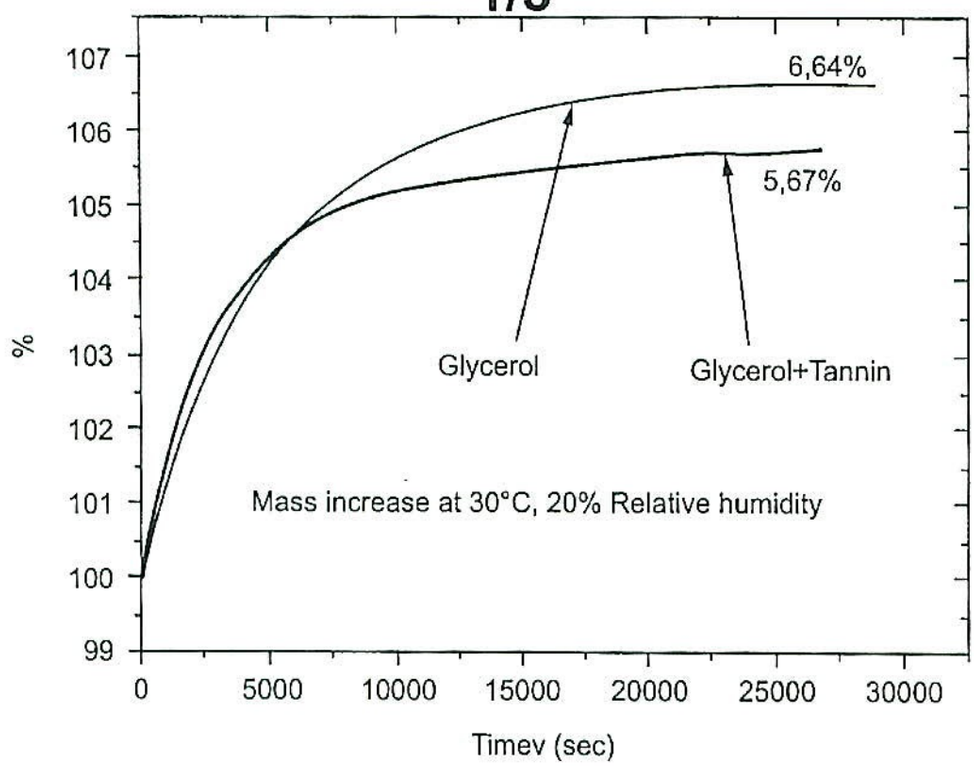

107
106
105
104
103
102
101
100
99
%
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
Timev (sec)
6,64%
5,67%
Glycerol
Glycerol+Tannin
Mass increase at 30°C, 20% Relative humidity

Fig. 1

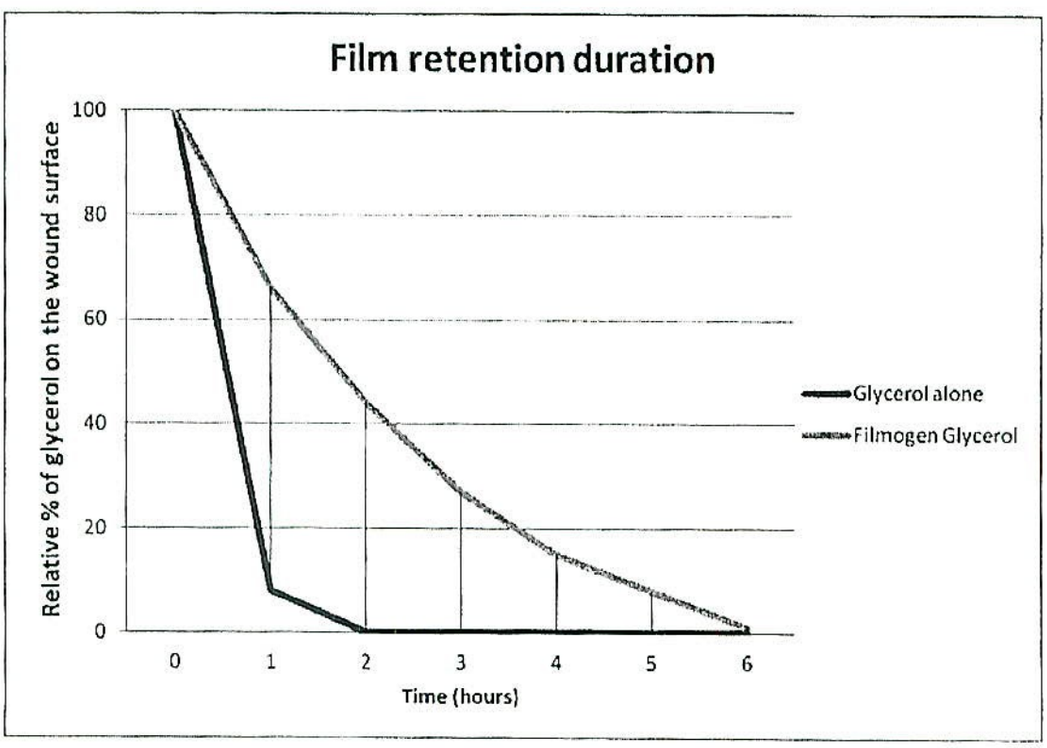
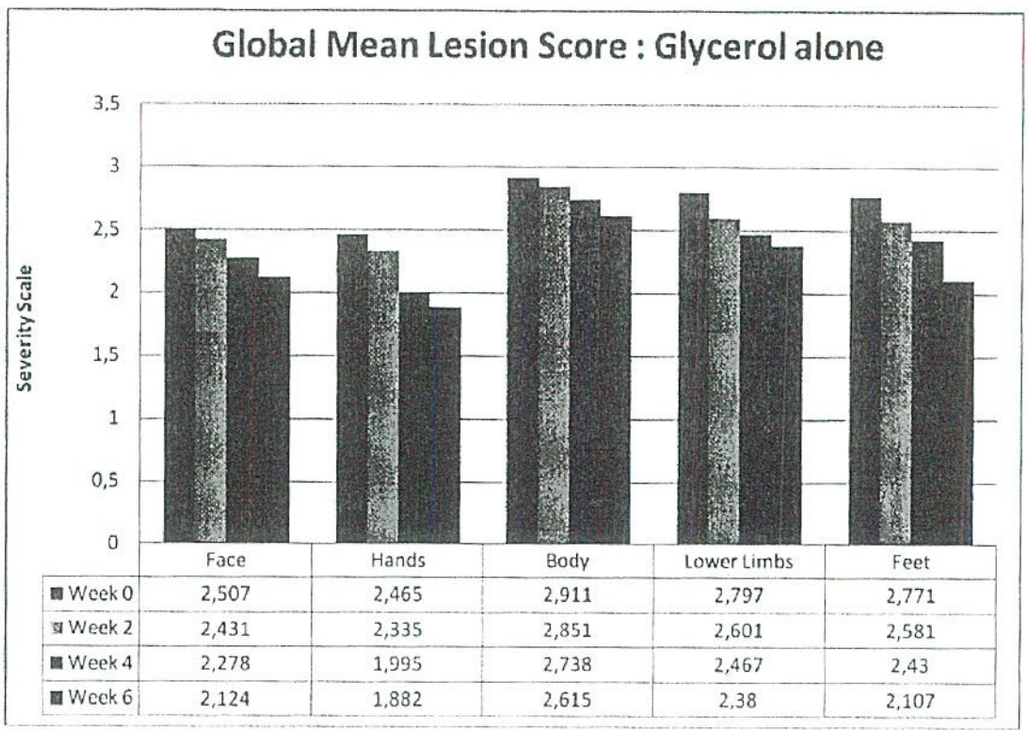
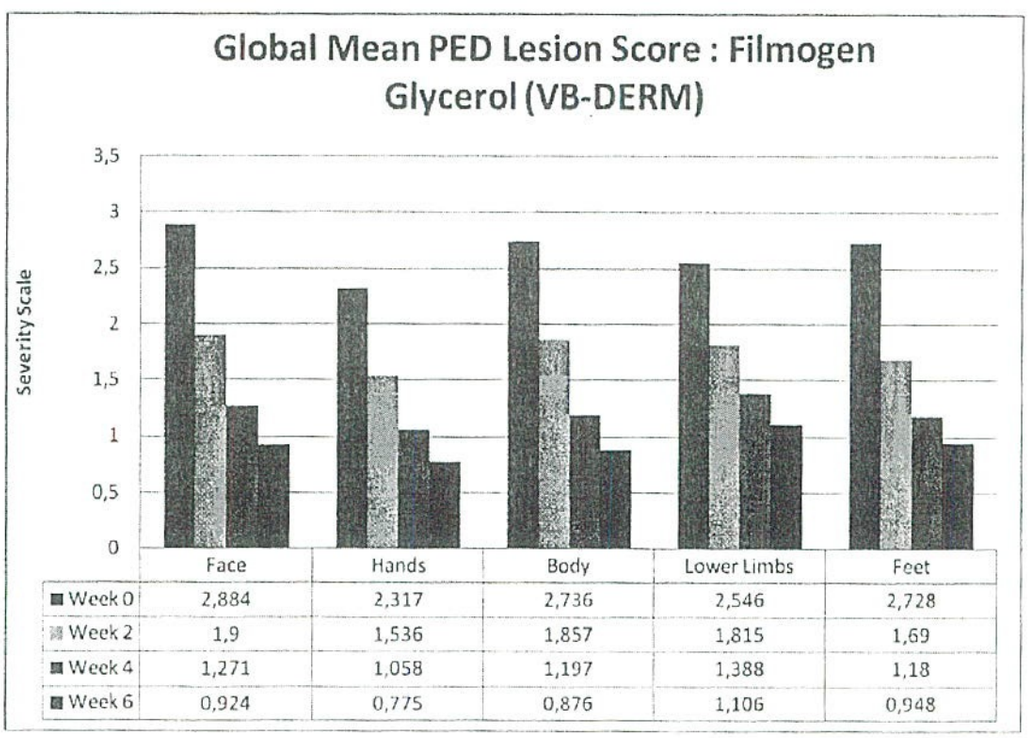

Film retention duration
Relative % of glycerol on the wound surface
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
Time (hours)
Glycerol alone
Filmogen Glycerol

Fig. 2



	Face	Hands	Body	Lower Limbs	Feet
Week 0	2,507	2,465	2,911	2,797	2,771
Week 2	2,431	2,335	2,851	2,601	2,581
Week 4	2,278	1,995	2,738	2,467	2,43
Week 6	2,124	1,882	2,615	2,38	2,107

Fig. 3



	Face	Hands	Body	Lower Limbs	Feet
Week 0	2,884	2,317	2,736	2,546	2,728
Week 2	1,9	1,536	1,857	1,815	1,69
Week 4	1,271	1,058	1,197	1,388	1,18
Week 6	0,924	0,775	0,876	1,106	0,948

Fig. 4

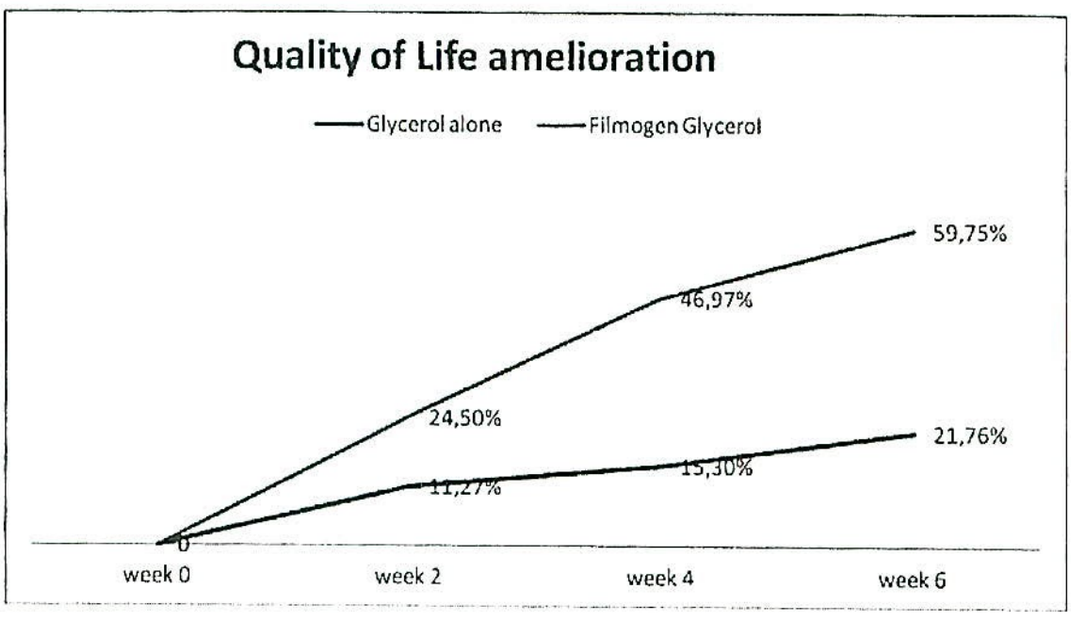

Quality of Life amelioration
Glycerol alone
Filmogen Glycerol
59,75%
46,97%
24,50%
21,76%
15,30%
11,27%
0
week 0
week 2
week 4
week 6

Fig. 5

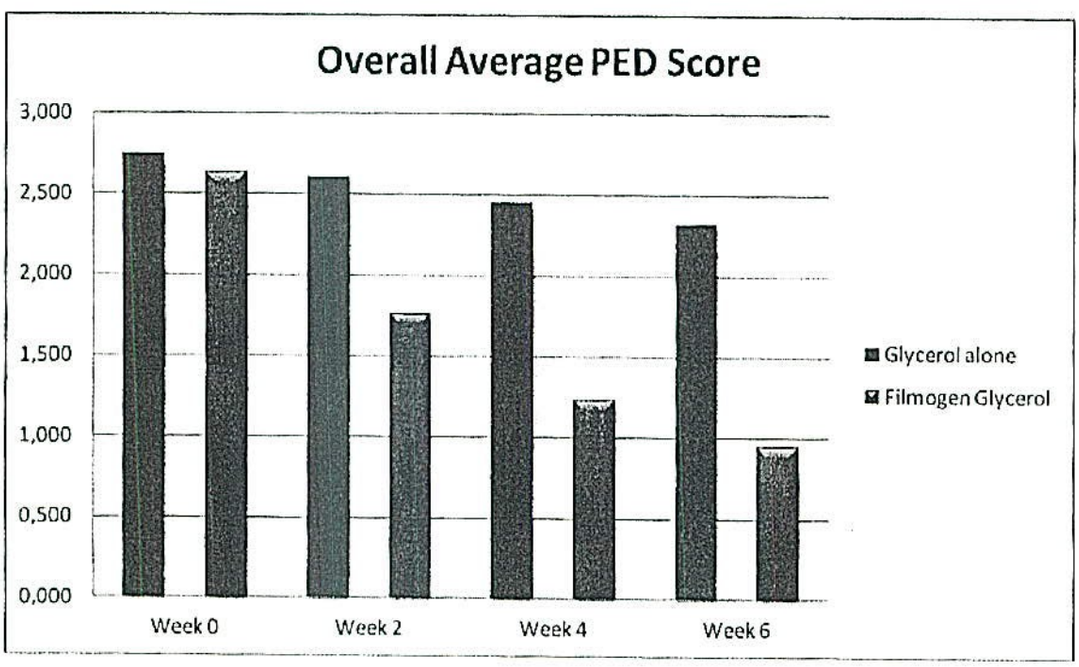

Overall Average PED Score
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
0,500
0,000
Week 0
Week 2
Week 4
Week 6
Glycerol alone
Filmogen Glycerol

Fig. 6

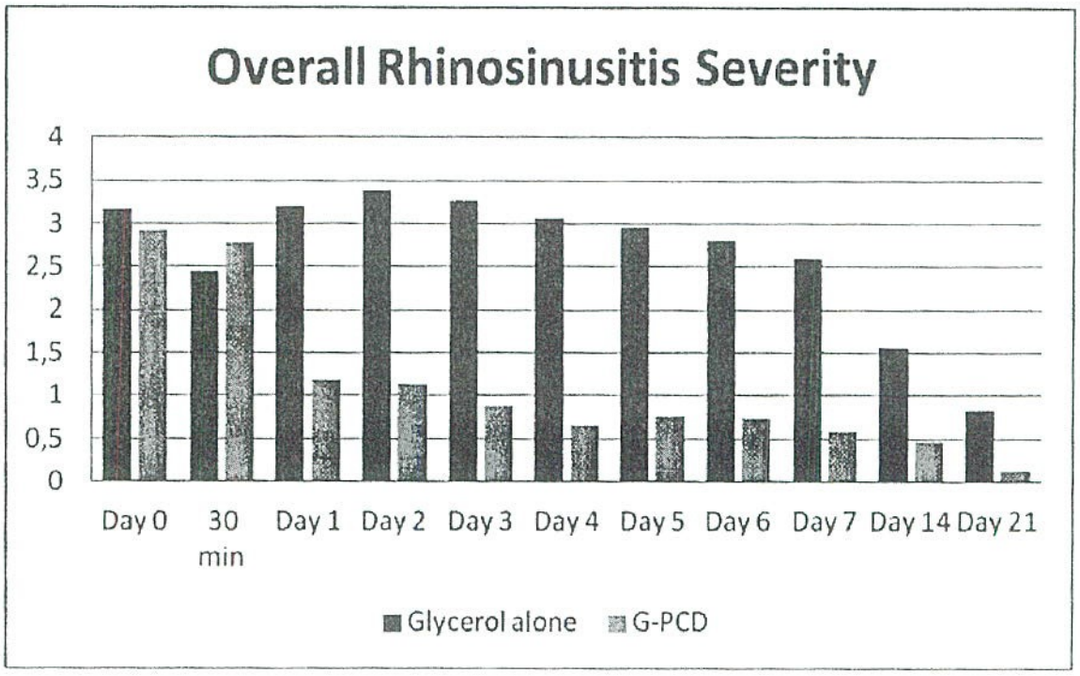

Overall Rhinosinusitis Severity
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Day 0
30 min
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
Day 14
Day 21
Glycerol alone
G-PCD

Fig. 7

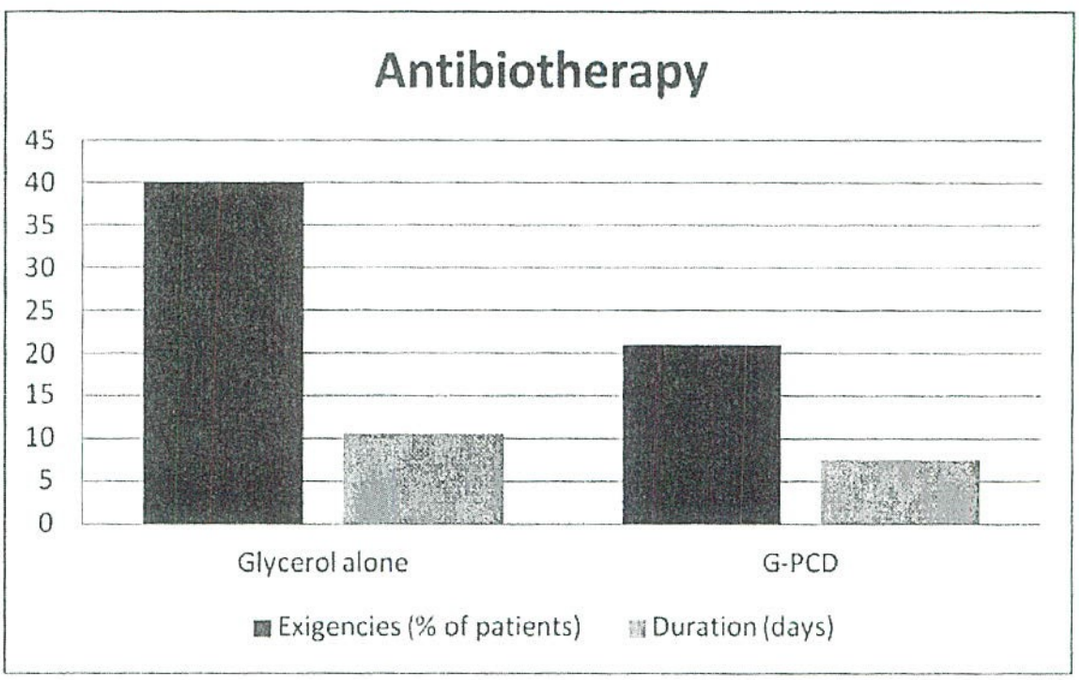

Antibiotherapy
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Glycerol alone
G-PCD
Exigencies (% of patients)
Duration (days)

Fig. 8

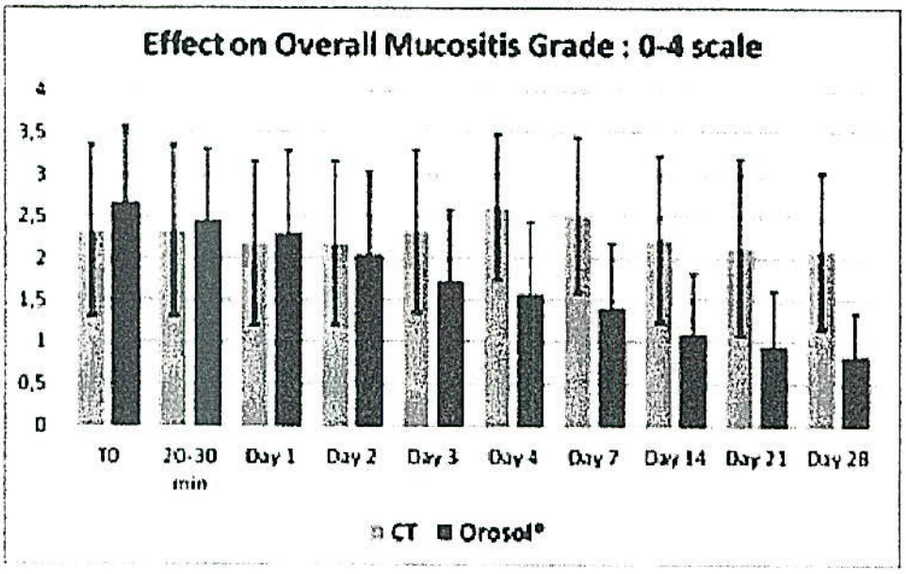

Effect on Overall Mucositis Grade : 0-4 scale
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
T0
20-30 min
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 7
Day 14
Day 21
Day 28
CT
Orosol®

Fig. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/061835

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K9/00 A61K47/10 A61K9/10 A61Q19/04 A61K31/05
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/213300 A1 (JOCHIM MELISSA [US] ET AL) 4 September 2008 (2008-09-04) paragraph [0068] - paragraph [0069]	1-15
X	FR 2 768 342 A1 (MASSON JEAN LOUIS [FR]) 19 March 1999 (1999-03-19) page 1, line 13 - page 2, line 8	1-15
X	US 3 923 984 A (ZUERCHER CARL J) 2 December 1975 (1975-12-02) claim 2 column 3, line 20 - column 4, line 19	1-15
X	DE 203 10 234 U1 (SCHMITT MARTIN [DE]) 18 September 2003 (2003-09-18) example 1	1-15

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 July 2013	17/07/2013

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Schifferer, Hermann

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/061835

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ADAM-S BIOCEANU-S BRETOIU-M GIURGIU-M PLESA-G-D: "Shaving cream having antiseptic and antifungal activity - contg. calendula and salvia extracts in cream compsn. comprising boric acid stearic acid, glycerol, coconut oil, alkali hydroxide and water", DERWENT, 30 April 1985 (1985-04-30), XP002239626, abstract ----	1-15
X	JP 2003 238435 A (DAIICHI SEIYAKU CO) 27 August 2003 (2003-08-27) abstract ----	1-15

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2013/061835

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008213300 A1	04-09-2008	NONE	
FR 2768342 A1	19-03-1999	NONE	
US 3923984 A	02-12-1975	NONE	
DE 20310234 U1	18-09-2003	NONE	
JP 2003238435 A	27-08-2003	NONE	

UN GLICEROL FILMÓGENO PARA APLICACIÓN TÓPICA

ANTECEDENTES

Casi todas las lesiones en la piel y la mucosa, sean de origen bacteriano, viral, inmunológico o traumático, implican daño celular y su curación está relacionada directamente con la sustitución de las células dañadas. Para crecer, las células necesitan un ambiente hidratado y limpio, libre de patógenos, libre de sustancias químicas y libre de proteínas residuales y de enzimas proteolíticas. En estas condiciones, las células madre secretan una matriz celular compuesta por partículas de colágeno, elastina, laminina, fibronectina y otras proteínas en libertad, que forman un cojín para la fijación de las células hijas. En ausencia de esta matriz, las células hija no tienen soporte sobre el que fijarse y, por tanto, no pueden crecer; en consecuencia, la lesión no puede cicatrizar.

Las lesiones tópicas en la piel y en la mucosa que implican daño celular son extremadamente difíciles de curar ya que, además de contener células muertas, residuos celulares y múltiples enzimas proteolíticas que impiden el crecimiento celular y la reparación de heridas, dichas lesiones permanecen abiertas al ambiente externo y a menudo se contaminan. Esta es la razón por la cual la mayoría de las heridas crónicas, como las úlceras por presión, las úlceras diabéticas o las úlceras venosas en las piernas, no se curan nunca y casi el 40 % de los pacientes mueren antes de experimentar la resolución de las heridas.

En la actualidad no hay ninguna sustancia o producto que

tenga todas las diversas propiedades esenciales necesarias y no se dispone de ningún tratamiento completo para las lesiones de la piel y la mucosa. Por ejemplo, en la actualidad no hay ningún tratamiento para curar las heridas crónicas. Todos los fármacos disponibles actúan como antisépticos, antibióticos para reducir el crecimiento microbiano, como hidrogeles o alginatos para mantener la herida hidratada, como analgésicos o anestésicos para reducir el dolor, como preparaciones que contienen colágeno o ácido hialurónico para suministrar uno de los componentes de la matriz celular, o consisten en piel modificada por ingeniería o injertos de piel para sustituir a la piel, pero ninguno de estos tratamientos está dirigido a limpiar la lesión y a favorecer el proceso de reparación natural de la piel o la mucosa a través de la estimulación del crecimiento celular.

La misma falta de tratamiento eficaz se sostiene para las infecciones virales tópicas, tales como herpes labial, herpes genital, rinosinusitis y gripe, en las que hay presentes grandes cantidades de partículas de virus libres sobre la superficie biológica infectada y siguen atacando a las nuevas células sanas con la ayuda de proteasas disponibles tópicamente. Una infección vírica a menudo está mediada por múltiples proteasas presentes sobre la superficie de la lesión. En la actualidad, no existe ningún fármaco para reducir la cantidad de partículas víricas libres o de proteasas, los principales agentes de infección. Para tratar la infección viral de garganta, el agua salada o las gárgaras con agua salada sigue considerándose uno de los mejores remedios, ya que estas soluciones osmóticamente activas forman una película hipertónica sobre la mucosa de la garganta y la resultante exudación hacia fuera de líquido

hipotónico reducen la carga contaminante sobre la superficie de la garganta. Por desgracia, esta película de solución hipertónica se diluye en unos minutos por acción del líquido hipotónico que está saliendo, lo que limita la eficacia de dicho tratamiento. Incrementar la concentración de sal o de otros ingredientes osmóticos no se recomienda debido a la fuerte irritación, el daño celular y el ardor de la mucosa resultantes, o porque la presencia de una sustancia química tóxica en las proximidades de las células bloquearía el crecimiento celular.

Por tanto, es altamente importante encontrar una sustancia capaz de satisfacer los múltiples requisitos de limpiar la superficie infectada de todos los contaminantes, tales como bacterias en flotación libres, partículas virales, células muertas, residuos celulares, proteínas muertas, metaloproteasas de la matriz, factores de crecimiento, citocinas, proteasas o partículas de polvo, para proporcionar un entorno esencial para el crecimiento celular y la reparación de tejidos, sin ningún efecto tóxico sobre las células o la matriz celular.

El glicerol, un poliol con múltiples grupos hidroxilo, es una solución hidrofílica viscosa, transparente, segura y osmóticamente activa de origen natural o sintético. El glicerol normalmente se usa como ingrediente alimentario, conservante y humectante, y entra en la composición de muchos cosméticos y productos farmacéuticos. El glicerol se usa ampliamente para aplicación tópica sobre heridas y quemaduras, a menudo como excipiente en asociación con otros principios activos. En todas estas preparaciones, el glicerol se usa como vehículo, diluyente, potenciador de la

viscosidad, humidificador o modulador del sabor, pero no como principio activo para tratar una patología tópica de la piel o la mucosa.

Una piel o mucosa dañados actúa como membrana semipermeable y permite que se produzca la ósmosis. El flujo de disolventes través de una membrana semipermeable constituye el flujo osmótico u ósmosis. La presión requerida para lograr el equilibrio osmótico se conoce como presión osmótica. Cuanto mayor sea la concentración de un disolvente, más presión osmótica se ejerce. El agua dulce se considera isotónica con una densidad de 1000 kg/m^3. El agua de mar y el glicerol tienen densidades de 1.025 kg/m^3y 1.259 kg/m^3, respectivamente. La presión osmótica ejercida por el glicerol es casi 10 veces mayor en comparación con el agua de mar. La concentración de solutos del glicerol es también mucho mayor en comparación con el agua de mar. Es la concentración total de soluto en una solución lo que determina el flujo osmótico de líquido, ya que la ósmosis está impulsada por diferencias en las concentraciones de soluto/disolvente que existen través de una membrana semipermeable. La concentración total de solutos se puede determinar a través de la osmolalidad de la solución. La osmolalidad del agua de mar, que contiene 3,4 % de NaCl, 0,581 moles / kg (solutos totales / mol en peso / kg), en comparación con 10,86 moles / kg de glicerol. Esto demuestra que el glicerol puro es casi 18 veces más osmóticamente activo que el agua de mar. Por lo tanto, glicerol podría haber sido un producto de elección para la aplicación en superficies infectadas con el fin de generar flujo de salida osmótico de líquido hipotónico y para limpiar la lesión. Desafortunadamente, el líquido hipotónico exudado diluye inmediatamente el glicerol y lo drena desde la

superficie de la herida en unos minutos, lo que limita estos efectos de limpieza.

Por tanto, existe la necesidad de un tratamiento seguro y no irritante con las múltiples propiedades de ser hidratante, limpiador, antiséptico, y que también tenga actividad antibacteriana, antiviral, y anti-proteasa.

El documento WO 00/74668 divulga el uso de soluciones hipertónicas osmóticamente activas para el tratamiento de lesiones tópicas concerniente al uso de glicerol como solución viscosa para aplicación tópica para el tratamiento de úlceras o heridas superficiales, que comprende glicerol como principio activo y un extracto hidroglicerinado de *Alchemilla vulgaris* como agente estimulante del crecimiento celular. Sin embargo, el glicerol usado en el documento WO 00/74668 no es filmógeno, y por lo tanto, no puede aportar las ventajas detalladas anteriormente. El uso de glicerol solo como un agente terapéutico para limpiar el tejido infectado o dañado no es habitual, ya que, debido a la ósmosis, el fenómeno de flujo de salida de líquido hipotónico de las partes internas del tejido, el glicerol se diluye en unos pocos minutos, pierde progresivamente sus propiedades osmóticas y su actividad, y no actúa satisfactoriamente como agente de limpieza total. La película de glicerol debe permanecer en la membrana del tejido vivo semipermeable durante al menos 30 minutos para generar suficiente ósmosis para limpiar la superficie del tejido biológico.

La presente invención aborda el problema de cómo mejorar el tiempo de retención de la película de glicerol por una superficie biológica viva con el fin de superar las

desventajas mencionadas anteriormente.

En segundo lugar, la crioconservación es un proceso en el que las células, los tejidos enteros o cualquier otra sustancia susceptible de sufrir daños causados por la reactividad química o el tiempo, se conservan mediante refrigeración a temperaturas bajo cero. A temperaturas lo suficientemente bajas, cualquier actividad enzimática o química, que pudiera provocar daños al material en cuestión, se detiene con eficacia Los procedimientos de crioconservación tratan de alcanzar temperaturas bajas sin engendrar daños adicionales causados por la formación de cristales de hielo durante la congelación. Para el almacenamiento a largo plazo de las células vivas, el crioprotector debe ser no tóxico para las células y ser capaz de prevenir la formación de cristales.

Esto es particularmente importante para el almacenamiento o conservación de las células vivas y el tejido (ejemplo: Injerto de piel), ya que las probabilidades de recuperar con éxito las células o de injertar tejidos disminuyen a medida que aumenta el número de células muertas o en proceso de morir.

Actualmente, se usan como medio crioprotector DMSO (dimetilsulfóxido), suero bovino humano fetal (FCS) o humano, y glicerol para proteger las células contra las temperaturas de congelación y los daños de los cristales de agua, y, por lo tanto, minimizan la mortalidad celular. Desafortunadamente, ninguno de estos crioconservantes es capaz de conservar las células durante un largo período de tiempo, es decir, de unos meses a algunos años. Normalmente, el 30-40 % de las células muere a los pocos días y más del 50

% a los pocos meses de la crioconservación de células vivas (Bravo et al. Burns 26(4), 367-78, 2000), debido, en particular, al daño celular causado por la formación de cristales de agua.

Por tanto, existe la urgente necesidad de encontrar un crioconservador que sea capaz de formar una película fina alrededor de las células o el tejido y protegerlos de las agresiones externas, así como de la formación de cristales de agua, con el fin de mejorar la viabilidad celular.

SUMARIO

Para resolver los problemas detallados anteriormente, los inventores proporcionan una preparación de glicerol que contiene taninos vegetales específicos capaces de unirse a moléculas de glicerol y, de este modo, mejorar las propiedades filmogénicas y el periodo de tiempo de retención de la preparación de glicerol en las membranas biológicas semipermeables. Este glicerol filmógeno puede usarse como un tratamiento natural y seguro para la aplicación tópica, para tratar diversas infecciones de la piel y la mucosa, y para proteger los tejidos vivos durante la crioconservación.

La presente invención, por lo tanto, se refiere a una preparación para aplicación tópica que comprende glicerol y taninos vegetales. Los taninos vegetales tienen la capacidad de unirse a glicerol, de modo que el glicerol tiene cualidades filmógenas.

En una realización, los taninos vegetales se eligen entre proantocianidinas.

En una realización preferida, estas proantocianidinas se obtienen de partes de una planta, o de la planta entera, seleccionándose la planta de *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, *saúco negro*, *Camellia sinensis*, *Glycine max*, *Acacia catechu*, *Fraxinus chinensis*, *Gingko biloba*, *Ribes nigrum*, *Tenacetum parthenium*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Opunitia sp.*, *Morus alba*, *Rubus sp.*, *Quercus sp.*, *Pinus sp.*, y combinaciones de las mismas.

En una realización más preferida, la fracción de taninos rica en proantocianidina se obtiene de partes de una planta, o de la planta entera, seleccionándose la planta de *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, *saúco negro*, *Camellia sinensis*, *Ribes nigrum*, *Acacia catechu*, *Fraxinus chinensis*, *Gingko biloba*, *Glycine max*, y combinaciones de las mismas.

En otra forma realización, las proantocianidinas se sintetizan en lugar de obtenerse de plantas.

En una forma de realización, el contenido de glicerol en la preparación está comprendido entre 30 % y 99,99 % (v / v).
En una forma realización, la preparación comprende un principio activo. El principio activo puede seleccionarse de un fármaco, un antibiótico, un antiséptico, un nutriente, un anticuerpo, un factor de crecimiento o una proteína.

La presente invención trata, adicionalmente, del uso de la preparación descrita anteriormente para el tratamiento de infecciones de la piel y la mucosa.

La preparación descrita anteriormente puede usarse además para proteger, transportar, almacenar o congelar células, tejidos u órganos. En una forma de realización, la concentración de glicerol filmógeno en la solución final en comparación con otros diluyentes presentes en la solución final, tales como, por ejemplo, FCS, medio de cultivo, y DMSO, varía entre 2 y 50 % (v / v), preferentemente entre 10 y 30 % (v / v) y más preferentemente entre 15 y 20 % (v / v).

La presente invención se refiere también a un procedimiento para aumentar el tiempo de retención de una película de glicerol a través de una superficie biológica mediante la preparación de una solución de glicerol y de taninos vegetales que tienen la capacidad de unirse a moléculas de glicerol, y aplicar la solución sobre la superficie biológica.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para tratar infecciones de la piel y la mucosa, que comprende la etapa de aplicar una preparación como se ha descrito anteriormente sobre la zona afectada.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de preparación de glicerol filmógeno que comprende mezclar el glicerol o una solución de poliol con taninos vegetales que se unen al glicerol. En una forma de realización, los taninos vegetales pueden añadirse como un polvo o un líquido.

La mejora de las cualidades de filmógeno del glicerol con la adición de taninos y un aumento sustancial en la eficacia terapéutica de filmógeno en comparación con glicerol no filmógeno se muestra en los estudios tal como se describe en los ejemplos y en las siguientes figuras:

FIGURAS

Fig. 1: Medición de la solubilidad de glicerol solo en comparación con glicerol filmógeno mediante análisis termogravimétrico (TGA).

Fig. 2: Duración de la retención de la película del glicerol filmógeno en comparación con el glicerol normal sobre heridas por diabetes.

Fig. 3: Medición de la gravedad media de los síntomas globales de las manifestaciones de psoriasis, eccema y dermatitis (PED): Efectos del glicerol solo - Grupo control.

Fig. 4: Medición de la gravedad media de los síntomas globales de las manifestaciones de psoriasis, eccema y dermatitis (PED): Efectos del glicerol filmógeno; grupo de tratamiento activo: Tratado con glicerol filmógeno VB-DERM como en las preparaciones n° 11 y 51 del ejemplo 5. Los resultados muestran que el glicerol filmógeno elimina totalmente todas las partículas en libertad de citocinas estimulantes del crecimiento, interleucinas e interferones, y normaliza el crecimiento de las células de la piel"

Fig. 5: Mejora de la calidad de vida de los pacientes de PED tratados con glicerol filmógeno en comparación con el glicerol normal.

Fig. 6: Efectos de los respectivos tratamientos (glicerol filmógeno en comparación con el glicerol normal) sobre la gravedad global de PED.-{}-

Fig. 7: Afección de rinosinusitis global; grupo control tratado con aerosol de glicerol normal; grupo con glicerol filmógeno tratado con un aerosol de glicerol filmógeno como en el ejemplo 5, preparación n° 5.

Fig. 8: Antibioterapia; necesidad comparativa de usar tratamiento antibiótico en el grupo control y el grupo de glicerol filmógeno.

Fig. 9: Efectos de Orosol (glicerol filmógeno) comparado con el tratamiento control (glicerol solo) sobre la mucositis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a una preparación de glicerol filmógeno para aplicación tópica que comprende glicerol y taninos vegetales. Los taninos vegetales tienen la capacidad de unirse a glicerol, de modo que el glicerol tiene propiedades filmogénicas. Esta calidad filmogénica produce una mejora del tiempo de retención de la película de glicerol por una superficie biológica viva. Como tal, la preparación está destinada para usar para el tratamiento de las infecciones de la piel y la mucosa.

El término glicerol filmógeno indica una solución de glicerol que contiene taninos específicos, naturales o sintéticos, o fracciones de taninos, que, cuando se aplican sobre una membrana biológica viva semipermeable, forman una película que opone resistencia a las fuerzas mecánicas ejercidas sobre ella mucho mejor de lo que lo haría el glicerol normal. Cuando es normal, el glicerol disponible comercialmente se aplica sobre una membrana biológica semipermeable, la

naturaleza hipertónica del glicerol atrae al líquido hipotónico de las partes internas del tejido vivo, lo que hace que el glicerol se diluya rápidamente, pierda potencia osmótica y detenga su actividad en 10-15 minutos después de su aplicación. Por otro lado, un glicerol filmógeno opone resistencia a la presión del flujo líquido que está saliendo ejercida sobre el mismo y se diluye pero lentamente, por lo que conserva su potencia osmótica durante un periodo de tiempo mucho mayor que el glicerol normal, es decir de 30 minutos a unas horas en función del punto de aplicación y la presión del flujo líquido hacia fuera.

El glicerol, también conocido como glicerina, incluye, por definición, compuestos de alcohol de azúcar que contienen más de un grupo hidroxilo (OH) unido a átomos de carbono separados de un esqueleto alifático. Este grupo incluye glicoles, glicerol y pentaeritritol, y también productos tales como trimetiloletano, trimetilolpropano, 1,2,6-hexanotriol, sorbitol, inositol, xilitol y poli(alcohol vinílico). Los polioles se pueden obtener de fuentes naturales o se pueden sintetizar. Los inventores han seleccionado el poliol más usado, es decir glicerol. El glicerol es una solución de alcohol de azúcar viscoso, que atrae al líquido hipotónico presente en los tejidos más profundos subyacentes a la superficie biológica mediante ósmosis, de modo que hidrata la superficie. Por desgracia, el flujo de líquido hipotónico de salida generado de este modo diluye el glicerol y disminuye progresivamente este efecto en unos minutos. La exudación hacia fuera del líquido hipotónico y, en consecuencia, los efectos de limpieza del glicerol, solo duran un periodo de 5 a 20 minutos y se necesitan aplicaciones frecuentes, lo que no es práctico. Esta es la

razón por la cual, a pesar de ser un buen agente osmótico, el glicerol solo se usa como humectante y no como fármaco adecuado para el tratamiento de lesiones tópicas.

El glicerol filmógeno significa un glicerol líquido viscoso que forma una película fina no plastificante, flexible, semipermeable y osmóticamente activa capaz de atraer al líquido hipotónico de las superficies biológicas vivas sobre las que se aplica y capaz de poner mejor resistencia a la disgregación o a la solubilidad en agua en comparación con el glicerol estándar.

Los taninos comprenden compuestos polifenólicos astringentes naturales que contienen suficiente hidroxilo y otros grupos adecuados, como carboxilos, para formar complejos fuertes con proteínas y otras diversas macromoléculas, tales como azúcares.

Los taninos pueden ser de origen natural, tales como taninos vegetales, o sintético. Siendo moléculas grandes y altamente ramificadas, los taninos monoméricos, diméricos y poliméricos tienen más probabilidades de unirse con azúcares adyacentes u otras moléculas en comparación con las flaconas pequeñas y simples. La presencia de grupos hidroxilo en los taninos permite la formación de reticulaciones estables con macromoléculas, tales como polioles, y esta reticulación ayuda a mejorar la resistencia mecánica de la película de poliol (glicerol). Dados los múltiples efectos tóxicos de los polímeros sintéticos citados en la literatura, los inventores han postulado que los taninos vegetales, que tienen una fuerte afinidad de unión a las proteínas pero también igual a otras macromoléculas, tales como polisacáridos, hidratos de

carbono y azúcares, pueden, cuando se añaden a los polioles, mejorar las propiedades filmogénicas del poliol, por ejemplo glicerol. Los taninos constituyen una solución excelente como: (1) los taninos son moléculas inertes y no tienen interacciones con estructuras celulares; (2) los taninos no son tóxicos y no irritantes cuando se aplican sobre un tejido vivo; (3) los taninos son moléculas muy grandes y no pueden entrar en las células; y (4) los taninos se pueden incorporar en el glicerol para formar una solución homogénea.

En general, los taninos se clasifican en dos grupos amplios: taninos hidrolizables y condensados. Como el nombre indica, los taninos hidrolizables son hidrolizados rápidamente por ácidos o enzimas y los productos de esta hidrólisis son ácido gálico o ácido elágico. Tras la destilación en seco, el ácido gálico y otros componentes se convierten en pirogalol. Los taninos condensados son mucho más resistentes a la hidrólisis. Están formados por pigmentos flavonoides. En presencia de ácidos minerales o enzimas, se descomponen en flobafenos de color rojo que son insolubles en agua. Las proantocianidinas (PCD) son polímeros fenólicos condensados que contienen unidades de flavan-3-ol unidas entre sí a través de enlaces de C4-C6 o C4-C8. La variación estructural de las proantocianidinas oscila desde dímeros y trímeros a oligómeros y polímeros más complejos en función del número de enlaces de catequina, hidroxilación y estereoquímica en los tres centros quirales (carbonos 2, 3 y 4) del anillo C que no es susceptible a la escisión mediante hidrólisis. Los inventores han observado que las proantocianidinas (PCD) formadas a partir de 2 a 5 moléculas de catequina o epicatequina son especialmente adecuadas para la unión macromolecular.

En una forma de realización de la presente invención, los taninos vegetales se eligen de proantocianidinas o procianidinas (PCD).

En una realización preferida, estas proantocianidinas se obtienen de partes de una planta, o de la planta entera, seleccionándose la planta de *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, *saúco negro*, *Camellia sinensis*, *Glycine max*, *Acacia catechu*, *Fraxinus chinensis*, *Gingko biloba*, *Ribes nigrum*, *Tenacetum parthenium*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Opunitia sp.*, *Morus alba*, *Rubus sp.*, *Quercus sp.*, *Pinus sp.*, *Rheum emodi* y combinaciones de las mismas.

En otra forma realización, las proantocianidinas se sintetizan en lugar de obtenerse de plantas.

Los inventores han descubierto a través de sus estudios (véase el ejemplo 3. Estudios farmacológicos) que determinadas PCD o sus combinaciones) son muy filmogénicas, lo que significa que aumentan la duración de la retención de la película de glicerol entre 200 y 300 % en comparación con el glicerol solo. Estas combinaciones consisten preferentemente en: *Vaccinium myrtillus* (extracto del fruto) + *Vaccinium macrocarpon* (extracto del fruto); *Vitis vinifera* (extracto de la semilla) + *Saúco negro* (extracto del fruto); *Camellia sinensis* (extracto de la hoja) + *V. myrtillus*; *V. myrtillus* + *s. negro*; *C. sinensis* + *V. vinifera* + *s. negro*; V. *Vinifera* + *s. negro* + *Glycine max* (extracto de la semilla); *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. vinifera*; y *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. myrtillus* + *V. vinifera*.

En comparación, se ha encontrado que las siguientes combinaciones de extractos de plantas ricos en taninos tienen altas cualidades filmogénicas, lo que significa que aumentan la duración de la retención de la película entre 100 y 200 % en comparación con el glicerol solo. *Acacia catechu* + *Fraxinus chinensis* (corteza y la planta entera); *F. chinensis* + *Salvia officinalis* + *G. biloba*; *Rosmarinus officinalis* + *Ribes nigrum*; *Gingko biloba* (raíces) + polímeros sintéticos. Además, se ha especificado que otro grupo tiene cualidades moderadamente filmogénicas, lo que significa que aumentan la duración de la retención de la película entre 20 y 99 % en comparación con el glicerol solo: *Morus alba* (frutos) + *Rubus sp.* (frutos); *Quercus sp.* (frutos, corteza)+ *Pinus sp.* (corteza, fruto). *Tenacetum parthenium* (flores y hojas) + *Salix alba* (la planta entera); *Rheum emodi*+ *Opunitia Sp.* (frutos) + *Pinus sp* (corteza).

Estas combinaciones son intercambiables.

Es bien sabido que los polioles y los polímeros contienen suficientes moléculas de oxígeno libre para formar fuertes enlaces de hidrógeno con el grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos. Se han realizado muchos estudios con polímeros sintéticos o naturales, hidrosolubles o insolubles en agua, purificados o brutos, para investigar la biodisponibilidad y digestibilidad de los taninos vegetales, para preparar polímeros y plásticos sintéticos, para mejorar la viscosidad o rigidez de los materiales o para cuantificar los taninos, pero el uso de taninos o polímeros para mejorar las propiedades filmogénicas del glicerol para aplicación tópica para tratar las lesiones en la piel o la mucosa nunca se ha estudiado.

Debe entenderse que la presente invención no se refiere al uso de glicerol como plastificante o al uso de glicerol como humectante en la piel. La adición de taninos en el glicerol no cambia la viscosidad del glicerol o la película del glicerol en la membrana biológica, pero potencia la adherencia del glicerol a la membrana biológica viva.

El objetivo de la investigación realizada por los inventores era identificar taninos vegetales, en particular la fracción de procianidina (PCD) de los taninos vegetales, que se puede unir a las moléculas de glicerol para formar una película de glicerol resistente mecánicamente capaz de permanecer intacta sobre la membrana biológica durante la exudación del líquido hipotónico. Siendo la finalidad implementar esta película hipertónica, óptimamente bioadhesiva, osmóticamente activa y segura como tratamiento eficaz para limpiar lesiones, eliminar contaminantes de la lesión, mantener la lesión hidratada, proteger la matriz celular y preparar un terreno favorable para el crecimiento celular en un ambiente no tóxico y libre de sustancias químicas.

Los inventores han identificado taninos vegetales específicos de unión a glicerol capaces de mejorar la resistencia mecánica de la película de glicerol y, de este modo, mantener la película intacta sobre células vivas durante un período de tiempo mucho más largo en comparación con el glicerol solo. Esta mayor duración de la retención del glicerol filmógeno sobre una superficie de o mucosa dañada hidrata de manera eficaz y limpia la superficie biológica, además de eliminar todos los contaminantes que flotan libremente presentes en la superficie. La ausencia de contaminantes y un medio ambiente limpio y húmedo aceleran la curación del tejido dañado. La

película de glicerol protege igualmente la superficie dañada de las agresiones externas.

El glicerol también se usa como crioprotector, mientras congela las células y los tejidos a bajas temperaturas (de -70 a -196 °C). Los grupos hidroxilo de glicerol interaccionan con H_2O y bloquean las propiedades de formación de cristales de agua. La organización molecular del H_2O se modifica, lo que conduce a una menor formación de cristales de agua durante la congelación y a pocos daños celulares. Generalmente, el glicerol se usa hasta una concentración entre 5 y 20 % junto con DMSO (1-5 %), suero (10-20 %) y medio de cultivo para congelar las células y los tejidos vivos. El DMSO convierte en porosa a la membrana celular, que protege a las células de los daños durante la descongelación mientras que el glicerol protege a las estructuras de membrana y mantiene la naturaleza de las proteínas internas.

A una concentración superior al 20 %, el glicerol se convierte en demasiado hipertónico y daña a las células debido a sus efectos osmóticos. Desafortunadamente, la supervivencia celular con estos crioprotectores rara vez supera el 60 %, lo que lleva a un mal injerto de los tejidos almacenados. No se ha observado que concentraciones más altas de cualquiera de estos ingredientes mejoren la supervivencia celular. La mala tasa de supervivencia celular se debe al hecho de que a pesar de las altas concentraciones de moléculas de glicerol presentes alrededor de las membranas de las células vivas, la deshidratación celular durante la congelación libera un gran número de moléculas de H_2O en la superficie de la membrana. Esta agua queda atrapada por el glicerol, pero como el glicerol no está presente como

33

película, algunas moléculas de agua cristalizan. Cristales de agua aumentan aún más la distancia entre las moléculas de glicerol libres y la membrana celular, lo que fomenta aún más la formación de cristales de agua y el consiguiente daño celular. Incluso después de considerables esfuerzos para encontrar una crioprotector filmógeno capaz de proteger la superficie de la célula completa y atrapar todas las moléculas de agua que se difunden desde el interior de la célula, todavía no se ha descubierto un crioprotector filmógeno seguro.

Los inventores han descubierto que un glicerol filmógeno que queda en estrecho contacto con las membranas celulares puede conservar mejor las células vivas en comparación con el glicerol solo. Por tanto, la preparación descrita anteriormente puede usarse además para proteger, transportar, almacenar o congelar células, tejidos u órganos. En una forma de realización, la concentración neta del glicerol filmógeno en la muestra varía entre 2 y 50 % (v / v), preferentemente entre 10 y 30 % (v / v) y en particular entre 15 y 20 % (v/v). Por lo tanto, el glicerol filmógeno constituye una excelente solución para superar esta dificultad y para evitar los daños por los cristales de agua a las células.

En una forma de realización de la presente invención, el contenido de glicerol en la preparación está comprendido entre 30 % y 99,99 % (v / v). El % de glicerol en la preparación para la aplicación tópica puede variar de acuerdo con la parte del cuerpo en la que se aplica el producto, por ejemplo un producto más espeso para su aplicación en las heridas crónicas abiertas, un producto menos espeso para su aplicación en la cavidad vaginal o una preparación mucho más

fina para su aplicación en la cavidad oral o nasal. El porcentaje de glicerol en la preparación puede variar entre 30 y 99,99 % (v / v), por ejemplo entre 90 y 99 % (v / v) para la aplicación vaginal, entre 70 y 99,9 % (v / v) para la aplicación sobre heridas de la piel, entre 30 y 60 % (v / v) para la aplicación sobre la mucosa sensible tal como la mucosa nasal.

En otra forma realización, la preparación comprende adicionalmente un principio activo. El principio activo puede seleccionarse de un fármaco, un antibiótico, un antiséptico, un nutriente, un anticuerpo, una proteína, un factor de crecimiento, o cualquier otra sustancia que requiera estar en contacto con la superficie dañada sobre la que se aplica la película de glicerol.

La preparación puede cargarse en tubos, recipientes de plástico, jeringas, ampollas, aerosoles, recipientes metálicos, en volúmenes de entre 1 y 500 ml, dependiendo del tipo de recipientes. El glicerol filmógeno también puede incorporarse en algodón, polímero, plástico, celulosa u otro tipo de apósito usado habitualmente para la aplicación sobre las heridas y lesiones.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para aumentar el tiempo de retención de una película de glicerol a través de una superficie biológica mediante la preparación de una solución de glicerol y de taninos vegetales que tienen la capacidad de unirse a moléculas de glicerol, y aplicar la solución sobre la superficie biológica.

La concentración de extractos de plantas ricos en taninos en el glicerol puede variar dependiendo de la concentración inicial y de la composición de los taninos usados para obtener el efecto filmógeno.

Los inventores han postulado la siguiente hipótesis sobre el mecanismo de funcionamiento de la preparación. Se puede aplicar una solución osmóticamente activa sobre superficies biológicas en las que las membranas plasmáticas de las células están expuestas al ambiente externo (lesiones en la piel en las que los queratinocitos de la piel están dañados y las células subyacentes están expuestas, membranas mucosas tales como la garganta, y las cavidades orales, nasales y vaginales) a fin de formar una película osmóticamente activa en la membrana biológica y crear un flujo de salida de líquido hipotónico. El flujo de salida del líquido debe separar y drenar las impurezas, tales como células muertas, membranas celulares, partículas de polvo, bacterias, partículas de virus, moléculas de proteínas que flotan libremente, tales como proteasas, etc ..., que tienen como resultado la limpieza de la lesión y la membrana mucosa. Este modo de acción mecánico produce efectos antibacterianos, antivirales, antisépticos, de limpieza e hidratantes, que son esenciales para estimular el crecimiento celular y la cicatrización. El agua de mar, que contiene 3-3,4 % de NaCl (sal), se usa habitualmente para limpiar lesiones o para hacer gárgaras, pero no es muy eficaz debido a que el flujo de salida del líquido hipotónico lo diluye instantáneamente y elimina la película osmótica, lo que limita la duración de acción de la solución salina a solo unos pocos minutos. Cuanto más corta sea la duración de la retención de la película hipertónica por la superficie biológica, menor será

su eficacia de limpieza.

El glicerol es mucho más viscoso que el agua de mar o una solución salina al 3 % y se mantiene sobre la membrana biológica durante un período relativamente más largo que el agua de mar. Dado que el glicerol es un producto no tóxico, no irritante, totalmente seguro y barato para la aplicación tópica como agente antiséptico, antiviral, de limpieza e hidratante, debería haberse usado ampliamente para tratar infecciones tópicas, heridas limpias y estimular la cicatrización de heridas. Pero este no es el caso porque el glicerol también es diluido por el flujo de salida de líquido hipotónico que genera a través de su actividad muy osmótica, y, en consecuencia, se elimina de la superficie solo unos pocos minutos después de su aplicación, lo que acorta considerablemente la duración de la acción del glicerol, y no permite el tiempo suficiente para limpiar bien la superficie. Esto explica por qué el uso de glicerol solo para la limpieza de superficies mucosas o heridas no es satisfactorio.

Los tres grupos hidroxilo del glicerol hacen que sea fácilmente soluble en agua mediante la formación de enlaces de hidrógeno con el agua. El glicerol diluido se elimina inmediatamente con el flujo de líquido hipotónico, que disminuye de forma progresiva pero rápidamente (en 5-10 minutos) el efecto osmótico del glicerol. La única solución para superar este problema sería seguir aplicando el producto varias veces, cada 10-15 minutos, para reconstituir la película osmóticamente activa, algo que no es práctico.

Por lo tanto, la mejor solución implica mejorar la duración de la retención de la película de glicerol sin alterar las

propiedades osmóticas o el perfil de seguridad del producto, a fin de proporcionar un procedimiento efectivo, seguro y barato para la limpieza de superficies biológicas.

Dado que el glicerol actúa sobre la superficie biológica exclusivamente a través de sus propiedades mecánicas, sin ninguna interacción biológica, farmacológica, metabólica o inmunológica con las membranas biológicas o células vivas subyacentes, es importante que la sustancia que se elige por su capacidad para mejorar las propiedades filmogénicas del glicerol sea similar o inerte.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para tratar infecciones de la piel y la mucosa, que comprende la etapa de aplicar una preparación como se ha descrito anteriormente sobre la zona afectada. En presente solicitud, el término piel se refiere a la piel de todas las áreas del cuerpo, incluyendo también, por ejemplo, la piel muy sensible de los labios. La presente preparación puede igualmente aplicarse sobre la piel y las membranas mucosas, tales como la cavidad oral, la garganta, las fosas nasales, los senos nasales, la piel y los tejidos dañados en la superficie del cuerpo, la cavidad vaginal y otras aberturas naturales del cuerpo. Las infecciones de la piel y la mucosa significan la presencia de cualquier patógeno o material indeseable sobre la superficie de la piel o la mucosa, de forma que interfiere con las funciones celulares normales o con el proceso de curación.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de preparación de glicerol filmógeno que comprende mezclar el glicerol o una solución de poliol con taninos vegetales que

se unen al glicerol. En una forma de realización, los taninos vegetales pueden añadirse como un polvo o un líquido.

La presente invención se ilustrada adicionalmente mediante los ejemplos siguientes aunque sin limitarse al contenido de los mismos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de extractos de plantas ricos en tanino

Inicialmente se seleccionaron 186 sustancias vegetales ricas en taninos para la preparación de extractos de plantas secas ricos en proantocianidina (PCD).

Los extractos de plantas ricos en PCD se prepararon a partir de diferentes materiales vegetales ricos en taninos, tales como frutas, semillas, pieles, pulpa de hortalizas, frutos secos, cortezas de árbol, y cualquier otro material vegetal rico en tanino. Se usó la materia prima como tal (húmeda), pero también podría haberse clasificado previamente mediante secado, separación y eliminación de los componentes con poco tanino.

Los extractos de plantas ricos en tanino se prepararon usando procedimientos estándar descritos en la literatura (Ajila CM. Crit Rev Biotechno, 31 (3) 227-249, 2011) y conocidos por el experto en la materia. En resumen, durante la fase inicial, se preparó una mezcla acuosa de material vegetal sólido que contiene proantocianidinas calentando aproximadamente 4 kg de material vegetal sólido con 24-40 litros de agua desionizada

(siendo la relación entre el material sólido y el agua de 1: 6 a 1:10), opcionalmente con mayor presión (presión de 60-100 psi) y a una temperatura entre 180 y 250 °C, durante un período que oscila entre 30 minutos y 5 horas, dependiendo de la rigidez del material vegetal procesado. Después de calentar, el extracto líquido se separó de los residuos más grandes haciendo pasar la mezcla a través de un paño de algodón. Los sólidos separados se desecharon y se recogió el líquido rico en PCD. A continuación, el extracto se secó mediante calentamiento (de 180-200 °C) o por atomización y se usó como extracto rico en PCD para diversos experimentos, así como para la incorporación en glicerol.

El contenido de proantocianidina en el extracto se determinó mediante el ensayo del butanol ácido de acuerdo con el procedimiento de Porter *et al.* (Porter *et al.* Phytochemistry, 1986). En resumen, 200 µg de extracto vegetal seco se diluyeron con 300 µl de 70 % de acetona y la solución se pipeteó en un tubo de ensayo de 100 x 12 mm. Se añadieron 3,0 ml de reactivo de butanol-HCl (95: 5) y 0,1 ml de ácido férrico al 2 % preparado en HCl 2N. El tubo se agitó con vórtex y después se tapó la boca del tubo con una canica de vidrio y se puso en el bloque de calentamiento a de 97 a 100 °C durante 60 minutos. Después, el tubo se dejó enfriar y la absorbancia se registró a 550 nm. La fórmula para calcular el porcentaje de taninos condensados como leucoantocianina equivalente es: (absorbancia 550 nm x 78,26 x factor de dilución) / (% de materia seca).

Sólo los extractos de plantas (42 de los 186 analizados) que tienen un valor de Porter superior a 200 y que indican una concentración alta de PCD se usaron análisis adicionales. Los

extractos no se purificaron para concentrar un tipo específico de tanino, ya que se obtuvieron mejores resultados con una mezcla de PCD y no con un tipo particular de tanino. Los extractos de plantas secas contienen principalmente bloques componentes de catequinas en dímeros, trímeros y pentámeros.

Ejemplo 2: Preparación de glicerol filmógeno

De acuerdo con el tipo de película de glicerol requerida para la aplicación tópica, se incorporó polvo seco que contiene de 0,1 a 8,0 % de PCD en el glicerol y se mezcló a fondo durante 6 horas a 37 °C en agitación para obtener una solución homogénea. El glicerol de origen vegetal se puede adquirir de proveedores tales como Interchimie en Francia. La preparación se cargó en tubos, recipientes de plástico, jeringas, ampollas, aerosoles, recipientes metálicos, en volúmenes de entre 1 y 500 ml, dependiendo del tipo de recipientes y el uso deseado.

Ejemplo 3 (a): Estudios farmacológicos: Medición de la capacidad de retención de la película de glicerol solo comparado con glicerol que contiene taninos vegetales diferentes

Se realizaron experimentos para estudiar los efectos de una nueva película de glicerol que contiene extractos de plantas ricos en PCD (glicerol filmógeno) en comparación con una película de glicerol sin PCD (glicerol normal) en condiciones idénticas. El objetivo de este estudio era seleccionar las PCD individuales, o sus asociaciones, que mejoran la retención de la película de glicerol por la membrana

biológica.

Modelo de ensayo:

En ausencia de cualquier modelo específico para estudiar la duración de la retención de la película por una superficie biológica, se usó un modelo *in vitro* de epidermis humana de varias capas para evaluar los efectos de la adición de concentraciones no citotóxicas de diferentes extractos de plantas ricos en PCD, ya sea individualmente o en diferentes asociaciones, en la retención de la película de glicerol. La epidermis humana se cultivó en un filtro de policarbonato permeable (1 cm de diámetro) y se mantuvo en una esponja empapada con medio de cultivo, quedando su superficie externa en contacto con el aire, como es el caso . A través de la acción capilar, el medio de cultivo se difunde a través del filtro de policarbonato y suministra nutrición a las células de la epidermis para mantener vivas esas células.

La inserción de uno o dos filtros de policarbonato adicionales aumenta la distancia entre el medio de cultivo y las células; después, la cantidad de medio disponible que llega a las células disminuye y, en ausencia, de nutrientes e hidratación, las células mueren. La muerte celular puede medirse mediante tinción con MTT vital (Ferrari MJ. J Immunol methods 13 (2), 165-172, 1990). El porcentaje de células vivas es proporcional a la duración de la retención de la película de glicerol por la superficie epidérmica.

Procedimiento de ensayo:

Varias preparaciones de glicerol que contienen productos de

ensayo (principalmente extractos de plantas ricos en PDC), A concentraciones que varían entre 0,1 y 5,0 %. Se añadieron extractos de plantas a la sustancia de la película para estudiar su efecto sobre las propiedades de adherencia a la célula de la película.

Cantidad de producto de ensayo aplicada por epidermis: 20 µl

Procedimiento de exposición:

Las preparaciones de glicerol se aplicaron directamente sobre la epidermis como capa fina con la ayuda de una pipeta (n = 6 por concentración): La epidermis se colocó sobre dos filtros y el producto de ensayo se aplicó en la superficie de la epidermis. Los filtros se mantuvieron en una esponja, que se insertó en una placa Petri que contenía una cantidad apropiada de medio para nutrir las células. Durante el período experimental, el filtro de cultivo celular se retiró suavemente a las 6 horas, 24 horas y 48 horas, y se agitó en un medio libre de suero durante un período de 20 segundos para permitir el desprendimiento de la película producto (cuando la película o los ingredientes de la película no estaban bien adheridos a la superficie epidérmica). La ausencia de película osmótica sobre la epidermis minimiza el suministro de medio de cultivo líquido a las células y causa la muerte celular. Según los resultados iniciales obtenidos para cada concentración de producto de ensayo en glicerol, la concentración de taninos vegetales aumentó o disminuyó para obtener efectos filmógenos máximos.

Condiciones de la exposición: 37 °C, 5 % de CO_2 durante 72 horas.

Mediciones de la viabilidad celular:

Coloración MTT y análisis histológicos. La viabilidad celular se calculó del siguiente modo:

Puntuación

4: 100 % de las células (en comparación con los controles) con intenso color azul.

3: Aproximadamente el 75 % de las células vivas con color azul oscuro.

2: Aproximadamente el 50 % de las células vivas con color azul medio.

1: Aproximadamente el 25 % de las células vivas con color azul claro.

0: Ninguna célula viva, color blanquecino de la epidermis.

Durante cada experimento, los resultados obtenidos para 6 epidermis en cada punto de tiempo se promediaron para determinar la supervivencia celular. Las puntuaciones medias de 3 experimentos individuales se promediaron para calcular el porcentaje de supervivencia celular media en comparación con las células tratadas con glicerol solo.

Controles:

Controles positivos: Ningún producto de ensayo, pero las mismas condiciones de ensayo que para los productos de ensayo. En estas condiciones casi el 95 - 100 % de las células mueren en un plazo de 72 horas.

Control de glicerol: Idéntico a los controles positivos, con la excepción de que el glicerol, libre de cualquier extracto

de PCD, se aplicó sobre la superficie del cultivo. En estas condiciones, casi el 60-70 % de las células mueren en un plazo de 72 horas debido al pobre suministro de nutrientes.

Resultados:

El % de supervivencia celular después de 72 horas fue el siguiente:

Controles positivos: 6.32 (± 2.4) %

Glicerol solo: 23,85 (± 4,8) %, indicando el 17,53 % una mayor supervivencia celular en comparación con los controles positivos. Esto demuestra que el glicerol ejerce efectos osmóticos para continuar nutriendo e hidratando las células.

Glicerol filmógeno: Cuando se añadieron extractos de plantas ricos en PCD o polímeros sintéticos al glicerol a concentraciones entre 0,1 y 5,0 %, la supervivencia celular se vio afectada de la siguiente manera:

Capacidad de retención de la película de glicerol muy alta ((+ 200 to + 300 % de células vivas en comparación con glicerol solo):

PCD de: (1) *Vaccinium myrtillus* solo y (2) asociación con taninos vegetales ricos en PCD de *Vaccinium myrtillus* (extracto del fruto) + *Vaccinium macrocarpon* (extracto del fruto); *Vitis vinifera* (extracto de la semilla) + *Saúco negro* (extracto del fruto); *Camellia sinensis* (extracto de la hoja) + *V. myrtillus*; *V. myrtillus* + *s. negro*; *C. sinensis* + *V. vinifera* + *s. negro*; V. *Vinifera* + *s. negro* + *Glycine max* (extracto de la semilla); *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. vinifera*; y *V. macrocarpon* + *C. sinensis* + *V. myrtillus* +

V. vinifera.

Capacidad de retención de la película de glicerol alta (+ 100 to + 199 % de células vivas en comparación con glicerol solo):

PCD de: (1) Acacia catechu (corteza y la planta entera), *Tenacetum parthenium* (flores y hojas); *Salix alba* (planta entera); *Salvia officinalis; Rosmarinus officinalis; V. macrocarpon; V. vinifera; C. sinensis; s. negro; Opunitia Sp.* (frutos), *individualmente, y (2) asociaciones de Fraxinus chinensis + Gingko biloba; Fraxinus chinensis + Gingko biloba + Camellia sinensis; V. vinifera + Ribes nigrum.*

Capacidad de retención de la película de glicerol moderada (+ 10 to + 99 % de células vivas en comparación con glicerol solo):

Morus alba (frutos); *Rubus sp.* (frutos); *Quercus sp.* (frutos, corteza), *Pinus sp.* (corteza, fruto).

También se obtuvo una actividad filmogénica moderada con polímeros sintéticos tales como polímeros que contienen sintano (ejemplo Blancotan SH2 y Ledosol CRP que se pueden adquirir en Silvateam s.p.a., Italia) o resinas poliméricas (tales como Aritan A7, una resina polimérica que contiene nitrógeno aniónico, que se puede adquirir en Arihant Dyechem empresa de India).

Conclusión:

Estos resultados demuestran que muchos taninos diferentes,

pero especialmente las catequinas diméricas a pentaméricas, naturales o sintéticas, son capaces de producir glicerol filmógeno mediante la unión con las moléculas de glicerol y son capaces de mejorar las propiedades mecánicas de la película de glicerol sobre la superficie biológica.

Con el fin de medir la calidad filmogénica de las preparaciones tal como se preparan en el ejemplo 2, se llevaron a cabo ensayos en los que se demostró de una manera indirecta que la calidad filmógeno de glicerol había aumentado.

Ejemplo 3(b): Estudios farmacológicos: Medición de la solubilidad del glicerol solo comparado con el glicerol filmógeno *in vitro*

Para verificar el efecto de la adición de taninos sobre la resistencia mecánica de glicerol a la solubilidad en el agua atraído a través de su propia actividad osmótica, se procedió a realizar un análisis termogravimétrico (TGA) de glicerol solo frente al glicerol filmógeno (que contiene 1 % de extracto vegetal rico en tanino). Una película de las sustancias de ensayo respectivas se expuso a una temperatura (30 °C) y humedad relativa (20 %) constantes y se midió el aumento de la masa relacionada con el tiempo. Por tanto, se podía cuantificar la solubilidad en agua (Fig. 1).

Los resultados preliminares muestran que el tanino disminuye la solubilidad en agua del glicerol. Supuestamente, la solubilidad reducida se puede imputar a que el tanino ocupa algunos de los grupos hidroxilo del glicerol, que, por lo tanto, no están disponibles para unirse a las moléculas de

agua.

Ejemplo 3(c): Estudios farmacológicos: Medición de la duración de la retención de la película de glicerol solo comparado con glicerol en filmógeno en úlceras diabéticas

Capacidad filmogénica del glicerol : Los experimentos se llevaron a cabo en pacientes con úlceras diabéticas que cubren una superficie aproximada de 4 (± 1,5) cm^2. Se aplicaron 2 ml de glicerol (grupo 1, n = 6 úlceras) o 2 ml de glicerol filmógeno (grupo 2, n = 6 úlceras) sobre la superficie de la herida y las heridas se mantuvieron en una posición vertical después de la aplicación. Se recogieron muestras de fluido de la herida (100 µl) a intervalos de una hora durante un período de 6 horas y se midió la cantidad de glicerol.

Se obtuvieron los siguientes resultados (véase la Fig. 2). Los resultados mostraron que en las condiciones experimentales de este estudio, casi el 92 % del glicerol normal se eliminó en 1 hora y el 100 % en 2 horas, en comparación con la reducción de solo el 34 % y el 56 % para el glicerol filmógeno. La actividad de la glicerol filmógeno duró 6 horas.

Ejemplo 4: Resultados de las mediciones de la unión tanino - glicerol y la producción de glicerol filmógeno

Como se muestra en el estudio farmacológico en el ejemplo 3, entre 42 extractos de plantas ricos en tanino mezclados con glicerol en diferentes concentraciones, ya sea individualmente o en diversas asociaciones, los siguientes

taninos vegetales (PCD) mostraron diferentes grados de cualidades filmogénicas:

Cualidad filmogénica muy alta: 6 extractos de plantas se clasificaron como muy altamente activas: *V. myrtillus, V. macrocarpon, V. vinifera, s. negro, C. sinensis* y *G. max* ya que aumentaban la duración de la retención de la película entre 200 y 300 % en comparación con el glicerol solo. Se obtuvo una calidad muy alta de la película de glicerol con: (1) Las PCD de *Vaccinium myrtillus* solo, así como en asociaciones con taninos vegetales ricos en PCD de (2) *Vaccinium myrtillus* (extracto del fruto) + *Vaccinium macrocarpon* (extracto del fruto); (3) *Vitis vinifera* (extracto de la semilla) + *Saúco negro* (extracto del fruto); (4) *Camellia sinensis* (extracto de la hoja) + *V. myrtillus;* (5) *V. myrtillus + s. negro;* (6) *C. sinensis +* (7) *V. vinifera + s. negro;* V. *Vinifera + s. negro + Glycine max* (extracto de la semilla); (8) *V. macrocarpon + C. sinensis + V. vinifera;* y (9) *V. macrocarpon + C. sinensis + V. myrtillus + V. vinifera.*

Cualidad filmogénica alta: 9 extractos de plantas se clasificaron como altamente activos ya que aumentaban la duración de la retención de la película entre 100 y 200 % en comparación con glicerol solo: *(1) Acacia catechu* (corteza y la planta entera), *Tenacetum parthenium* (flores y hojas); *Salix alba* (planta entera); *Salvia officinalis; Rosmarinus officinalis; Fraxinus chinensis, Gingko biloba; Ribes nigrum* (fruto), y *Opunitia Sp..* (frutos) así como polímeros sintéticos, tales como Aritan-A7, Ledosol CRP, y Blancotan SH2

41

Cualidad filmogénica moderada: 4 extractos de plantas se clasificaron como moderadamente activos ya que aumentaban la duración de la retención de la película entre 10 y 99 % en comparación con glicerol solo: *Morus alba* (frutos); *Rubus sp.* (frutos); *Quercus sp* (frutos, corteza), *Pinus sp* (corteza, frutos).

Estos resultados indican que: 1. Los taninos se unen a glicerol; 2. Algunos taninos vegetales se unen muy fuertemente con la molécula de glicerol, mientras que otros se unen con una fuerza menor. Esto demuestra que la unión del glicerol a los taninos es específica; 3. La unión de taninos a glicerol comienza tan pronto como los taninos se añaden al glicerol; 4. Los dímeros, trímeros y pentámeros de tanino muestran una unión y un efecto filmógeno más fuertes, en comparación con los polímeros o taninos condensados grandes. Esto puede estar relacionado con el hecho de que las moléculas de tanino más pequeñas tienen múltiples posibilidades de unirse al glicerol. Casi el 50 % de la unión PCD -glicerol se produce cuando ambos ingredientes se mezclan y se almacenan, y el 50 % restante cuando la solución se aplica como una película fina sobre la superficie de la piel o de la mucosa. Los polímeros sintéticos también pueden unirse a las moléculas de glicerol y mejorar la duración de la retención de la película de la película de glicerol.

Según estos hallazgos, el glicerol filmógeno se puede preparar mediante la mezcla de glicerol o cualquier otra solución de poliol con las PCD de plantas de unión a glicerol.

Ejemplo 5: Ejemplos de preparaciones para el tratamiento de

las infecciones de la piel y la mucosa

Se prepararon diferentes preparaciones de glicerol filmógeno como se detalla en el Ejemplo 2. Los porcentajes indican el peso / peso del extracto vegetal rico en PCD seco.

1. Glicerol - 69,22 %, extracto de *V. macrocarpon* - 0,18 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,18 %; Excipientes: Miel - 29,0 %, Aqua - 1,42 % cargado en tubos de 10 ml para tratar úlceras orales traumáticas.

2. Glicerol - 72,92 %, extracto de *V. macrocarpon* - 0,30 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,36 %; Excipientes: Miel - 12,0 %, Aqua - 14,42 % cargado en aerosol de 20ml para el tratamiento de la mucositis oral.

3. Glicerol - 74,265 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 0,48 %, extracto de fruto de *S. nigra* (saúco negro) - 0,32 %; Excipientes: Miel - 12,0 %, Aqua - 12,935 % cargado en aerosoles de 30 ml para aplicar en la garganta.

4. Glicerol - 73,94 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 0,48 %, extracto de fruto de *S. nigra* (saúco negro) - 0,32 %; extracto de semillas de *Glycine max* 0,07; Excipientes: Miel - 12,0 %, Aqua - 13,19 % cargado en aerosoles de 20ml para aplicar en la garganta en niños.

5. Glicerol - 32,488 %, extracto de *V. macrocarpon* - 0,12 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,12 %, extracto de *C. sinensis* - 0,22 %, extracto de frutos de *S. nigra* (saúco negro) - 0,10 %; Excipientes: Aqua - 66,952 %, cargados en 15 ml de aerosoles de plástico para el tratamiento de la rinosinusitis.

42

6. Glicerol - 68,66 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,18 %, extracto de *C. sinensis* - 0,30 %; Excipientes: Miel - 29,0 %, Aqua - 1,76 %, Goma xantana 0,1 %, cargados en tubos de 50 ml para aplicación tópica en úlceras producidas por presión.

7. Glicerol - 99,16 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,18 %, ácido cítrico c.s.p. pH 4,5; Excipientes: Aqua - 0,66 %, cargado en tubos de 10 ml con una cánula para el tratamiento de la sequedad vaginal y la infección.

8. Glicerol - 72,06 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 0,18 %. Excipientes: Miel 27,0 %, Aqua - 0,66 %. Goma xantana 0,10 %, cargada en tubos de 100 ml para aplicación tópica sobre lesiones de la piel.

9. Glicerol - 76,166 %, extracto de *C. sinensis* - 0,24 % , extracto de semillas de *V. vinifera* 0,36 %, extracto de frutos de *S. nigra* (saúco negro) - 0,20 %. Excipientes: Miel - 20,0 %, Aqua - 2,934 %, goma xantana 0,10 %, cargada en tubos PET de 6ml para aplicación tópica en las lesiones de herpes labial.

10. Glicerol - 97,48 %, extracto de *V. macrocarpon* - 0,18 %, extracto de fruto de *S. nigra* (saúco negro) - 0,36 %; ácido cítrico c.s.p. pH 4,5; Excipientes: Aqua - 1,98 %, cargado en tubos de 10 ml con una cánula para aplicación vaginal para tratar el herpes genital y la vaginosis bacteriana.

11. Glicerol - 76,42 %, extracto de *V. macrocarpon* - 0,12 %, extracto de *C. sinensis* - 0,48 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 0,36 %; Excipientes: Miel - 19,0 %, Aqua - 3,52 %, cargados en tubos de 50 ml para aplicación tópica sobre las lesiones de psoriasis, eccema y dermatitis.

12. Sorbitol - 94,7 %, extracto de *V. macrocarpon* - 2,1 %, *Acacia catechu* 3,2 %, cargado en tubos de 20 ml para aplicación tópica sobre úlceras venosas de las piernas.

13. Glicerol - 90,60 %, extracto de *V. macrocarpon* - 1,30 %, *Salix alba* - 5,0 %; Excipientes: Aqua - 3,1 0 %, cargado en tubos de 50 ml para la aplicación tópica sobre úlceras diabéticas.

14. Sorbitol - 74,265 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 0,48 %, extracto de fruto de *S. nigra* (saúco negro) - 0,32 %; Excipientes: Miel - 12,0 %, Aqua - 12,935 %, cargados en recipientes de plástico de 100 ml para aplicación tópica sobre quemaduras en la piel.

15. Sorbitol - 73,94 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 0,48 %, extracto de fruto de *S. nigra* (saúco negro) - 0,32 %; extracto de semillas de *Glycine max* 0,07; Excipientes: Miel - 12,0 %, Aqua - 13,19 %, cargados en jeringas de de 10 ml para aplicación tópica sobre heridas crónicas.

16. Sorbitol - 32,488 %, extracto de *V. macrocarpon* - 0,12 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,12 %, extracto de *C. sinensis* - 0,22 %, extracto de frutos de *S. nigra* (saúco negro) - 0,10 %; Excipientes: Aqua - 66,952 %, cargado en aerosoles de 50 ml para aplicación en la garganta para tratar la gripe.

17. Xilitol - 68,66 %, extracto de *V. myrtillus* - 0,18 %, extracto de *C. sinensis* - 0,30 %; Excipientes: Miel - 29,0 %, Aqua - 1,76 %, Goma xantana 0,1 %, cargados en tubos de 100 ml para el tratamiento de úlceras secas crónicas.

18. Glicerol - 95 %, extracto de *V. myrtillus* - 5,0 %, ácido cítrico c.s.p. pH 4,5, cargados en óvulos de 4 ml para su introducción en la vagina para tratar la vaginosis

bacteriana.

19. Glicerol - 50 %, Xilitol - 20 %, extracto de semillas de *V. vinifera* - 1,0 %. Excipientes: Miel 28,8 %, goma xantana 0,20 %, usado para mojar apósitos de poliéster para la aplicación sobre heridas crónicas.

20. 1 g de preparación de tanino vegetal que contiene 400 mg de extracto de *V. vinifera*, 350 mg de *V. macrocarpon*, 100 mg de *V. myrtillus* y 150 mg de almidón de arroz en polvo rociado sobre una gasa de algodón de 4 x 5 cm. Primero se aplica glicerol puro sobre la superficie dañada (6 ml sobre una superficie de 10 cm^2 de una úlcera crónica)y la superficie de la herida se ~~cierra~~ cubre con el apósito, dirigiéndose la parte de tanino rociada hacia la superficie de la herida.-{}-

21. Apósitos de tipo gasa no adhesivos de algodón de 5 x 5 cm empapados en una solución que contiene glicerol (82 %), 0,5 % de extracto de planta de *S. nigra* (saúco negro) y 17,5 % de miel y empaquetados en bolsas de aluminio. La gasa se aplica directamente tópicamente sobre la superficie dañada.

22. Glicerol - 76,0 %, extracto de *C. sinensis* - 0,5 %, extracto de semillas de *V. vinifera* 0,5 %, extracto de frutos de *S. nigra* (saúco negro) - 0,5 %. Excipientes: Miel - 22,5 % mezclada en un hidrogel y fijada en una superficie de polímero reticulado (10 g por 10 cm^2 de superficie polimérica) para aplicación tópica sobre úlceras por presión, úlceras diabéticas y úlceras venosas de piernas.

23. Glicerol - 97,48 %, extracto de *V. macrocarpon* - 2,10 %, extracto de frutos de *S. nigra* (saúco negro) - 0,42 %, adsorbido sobre un apósito de nanocompuesto de óxido de cinc flexible como un vendaje para curación de heridas para

úlceras por presión y úlceras diabéticas crónicas.

24. Glicerol - 68,66 %, Aritan-A7 - 0,18 %, *Fraxinus chinensis* - 0,30 %, Excipientes: Miel - 29,0 %, Aqua - 1,76 %, Goma xantana 0,1 %, cargados en tubos de 50 ml para aplicación tópica en úlceras producidas por presión.

25. Glicerol - 99,16 %, extracto de *R. nigrum* - 0,18 %, ácido cítrico c.s.p. pH 4,5; Excipientes: Aqua - 0,66 %, cargado en tubos de 10 ml con una cánula para el tratamiento de la sequedad vaginal y la infección.

26. Glicerol - 72,06 %, extracto de raíz de *G. biloba* - 0,18 %, Blancotan SH2 0,20 %, Excipientes: Miel 27,0 %, Aqua - 0,46 %. Goma xantana 0,10 %, cargada en tubos de 100 ml para aplicación tópica sobre lesiones de la piel.

27. Glicerol 99,5 %, Ledosol CRP polvo al 0,5 %, cargados en botes de 50 ml para aplicación tópica sobre lesiones en la piel producidas por psoriasis, eccema y dermatitis.

28. Glicerol 30 %, Miel 69,5 %, extracto seco de *Fraxinus chinensis* 0,50 %, cargado en recipientes de 50 ml para aplicación tópica en la superficie de la garganta para tratar infecciones virales de la garganta y de los senos.

Ejemplo 6: Experimentos de crioconservación; estudio comparativo sobre glicerol frente a glicerol filmógeno

El objetivo de este estudio fue comparar los efectos protectores de glicerol solo o en asociación con taninos o polímeros capaces de formar una película de glicerol sobre la superficie del tejido vivo y evaluar los efectos obtenidos sobre la supervivencia celular.

Células vivas y tejidos usados:

Los cultivos primarios de células de músculo liso vascular humanas (CML), fibroblastos de la piel, células epiteliales de riñón de rata, se cultivaron líneas celulares MDBK y MDCK en matraces de cultivo tisular de plástico de 25 cm^2. Las células se dispersaron con solución de tripsina - EDTA, se lavaron con medio y se preparó una suspensión de células que contiene $1x10^7$células / ml. También se prepararon suspensiones de linfocitos de sangre humana como muestras de células no adherentes. Del mismo modo, las muestras frescas de piel humana viva recogidas para hospitales se cortaron en piezas de 1 cm^2 y dos piezas de cada muestra de piel se crioconservaron en diferentes medios como se indica a continuación.

Se prepararon cuatro medios de congelación en DMEM (Medio Mínimo Esencial de Dulbecco) que contenía: (1) 5 % de DMSO, 10 % de FCS y medio de cultivo c.s.p. 100ml; (2) 2 % de DMSO + 10 % de suero y medio de cultivo c.s.p. 100 ml; (3) glicerol 20 %, FCS 10 %, 2 % de DMSO y medio de cultivo c.s.p. 100 ml; o (4) glicerol 20 %, PCD de plantas 1 %, FCS 10 %, DMSO 2 % y medio de cultivo c.s.p. 100 ml del denominado glicerol filmógeno. Los medios se almacenaron a DE 2 a 8 °C hasta su uso. Obsérvese que el medio de congelación adecuado depende de la línea celular específica.

Las suspensiones celulares se centrifugaron a aproximadamente de 100-200 x g durante 5 a 10 minutos y el sobrenadante se decantó sin perturbar los sedimentos celulares. Los sedimentos celulares se resuspendieron en medio de congelación frío a densidades de 1 x 10^8 células por ml. Las

alícuotas de la suspensión celular se dispensaron en viales de almacenamiento criogénico y se congelaron en un aparato de congelación a velocidad controlada, lo que disminuye la temperatura aproximadamente 1 °C por minuto hasta -70 °C. Después, los viales de cultivo de tejido y de células se transfirieron a recipientes de nitrógeno líquido (-196 °C) y se mantuvieron durante un período de 6 meses. La misma técnica se siguió para los injertos de piel.

Para la descongelación, se retiraron las ampollas y se dejaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 minuto y después se transfirieron a un baño de agua a 37 °C durante 2-3 minutos hasta que estén completamente descongelados. Las ampollas se limpiaron con alcohol al 70 % antes de abrir en un ambiente estéril. Las células se diluyeron en 10 ml de DMEM que contiene 5 % de FCS, se centrifugaron, se sedimentaron, se volvieron a diluir en medio de cultivo y el número de células vivas se determinó usando tinciones con azul tripán y MTT.

Los injertos de piel procesados de una manera similar, excepto que los injertos se cortaron en láminas de 5, se introdujeron en matraces de cultivo tisular de 25 cm^2 que contienen 15 ml de medio de crecimiento celular con 10 % de FCS y se cultivaron durante un período de 10 días. Después de 10 días de cultivo, las células del injerto en crecimiento se dispersaron con una solución de tripsina - EDTA, se preparó una suspensión de células y se contó el número de células vivas.

Resultados:

Número medio de células de cultivo celular viva: (1) 5 % de DMSO, 10 % de FCS en medio de cultivo = 65,2 %; (2) 2 % de DMSO + 10 % de suero en medio de cultivo = 62,6 %; (3) glicerol 20 %, FCS 10 %, 2 % de DMSO en medio de cultivo = 68,4 %; y (4) glicerol 20 % que contiene 1 % de PCD vegetales, FCS 10 %, DMSO 2 % en medio de cultivo denominado glicerol filmógeno= 91 %.

Número medio de células de injerto de piel viva: (1) 5 % de DMSO, 10 % de FCS en medio de cultivo = 51,1 %; (2) 2 % de DMSO + 10 % de suero en medio de cultivo = 54,9 %; (3) glicerol 20 %, FCS 10 %, 2 % de DMSO en medio de cultivo = 63,3 %; y (4) glicerol 20 % que contiene 1 % de PCD vegetales de *V. macrocarpon* (0,5 %) y *R. Nigrum* (0,5 %), FCS 10 %, DMSO 2 % en medio de cultivo denominado glicerol filmógeno= 83,8 %.

Conclusión: El glicerol filmógeno es mucho más eficiente, en comparación con glicerol solo, para la crioconservación de células dispersas individuales e injertos de tejido.

Ejemplo 7: Ejemplos de glicerol filmógeno crioconservante

Se prepararon diferentes preparaciones como se detalla en el Ejemplo 2. Los porcentajes indican el peso / peso del extracto vegetal rico en PCD seco.

1. 20 % de Glicerol, 0,5 % de PCD vegetal de *V. myrtillus*, 0,4 % de *A. catachu* y 0,1 % de *S. alba*; 5,0 % de DMSO, 20 % de suero bovino fetal, medio de cultivo c.s.p. 100 ml usado para almacenar las células vivas dispersas.

2. 20 % de Glicerol, 1 % de PCD vegetal (0,5 % de *V.*

macrocarpon y 0,5 % de *R. nigrum*), 10 % de FCS, 2,0 % de DMSO en medio de cultivo c.s.p. 100 %.

3. 10 % de glicerol, 1,0 % de PCD vegetales de semillas de *V. vinifera* y 0,5 % de s. negro, 2,0 % de DMSO, 10 % de suero bovino fetal, medio de cultivo c.s.p. 100ml, usado para almacenar los injertos de piel antes de injertar y transportar.

Ejemplo 8: Propiedades osmóticas *in vitro* de glicerol solo en comparación con glicerol que contiene 1 % en asociación de PCD vegetales como en la preparación n° 2 en el ejemplo 5 (código - Orosol)

En la ausencia de modelos para imitar la exudación osmótica de líquido hipotónico de la mucosa oral o vaginal, se usó un modelo de cultivo celular de epidermis humana que contiene células epiteliales humanas normales cultivadas en un filtro de policarbonato en una fase de aire/líquido. En condiciones óptimas se obtiene un cultivo de células de múltiples capas, equivalente a la superficie de la mucosa sobre un soporte de policarbonato. Este soporte coloca sobre una esponja en contacto con una cantidad definida de medio de cultivo. El medio se difunde en la esponja y el filtro, y suministra nutrientes, así como hidratación, a las células. En estas condiciones, el cultivo celular se puede mantener vivo durante al menos una semana.

Para crear un modelo experimental de sequedad de mucosa, los inventores insertaron uno o dos filtros adicionales entre las células y la esponja, de modo que redujeron la cantidad de medio líquido disponible para las células. En ausencia de hidratación, las células mueren y la mortalidad celular se

puede medir con un colorante vital MTT. La mortalidad celular es proporcional a la sequedad de la superficie de cultivo. Si se aplica una solución hipertónica osmóticamente activa sobre la superficie epidérmica expuesta a sequedad, el medio de cultivo es atraído hacia a la epidermis debido a la ósmosis y aumenta la cantidad de medio disponible para las células..¡ Por tanto, la supervivencia celular es proporcional a la extensión de la ósmosis y a la hidratación celular.

El objetivo de este estudio era evaluar las propiedades hidratantes de glicerol filmógeno en comparación con glicerol regular. El producto se aplicó sobre la superficie de la epidermis normal (sin filtro), ligeramente deshidratada (1 filtro) o intensamente deshidratada (2 filtros adicionales) (20 µl), y las células se incubaron a 37 °C-5 % de CO_2 durante una semana. Cada epidermis se lavó mediante agitación del cultivo en medio de cultivo durante 20 segundos los días 1, 3 y 5, y la viabilidad celular se midió el día 7 usando tinción con MTT.

Puntuación media de la supervivencia celular después de 1 semana de cultivo fue la siguiente:

1. Cultivos normalmente humidificados (sin filtro): 100 %
2. Controles parcialmente deshidratados sin producto: 43,11 %
3. Cultivos intensamente hidratados sin producto: 11,57 %
4. Cultivos parcialmente deshidratados con glicerol: 62,3 %
5. Cultivos intensamente deshidratados con glicerol: 43,15 %
6. Cultivos parcialmente deshidratados con glicerol

filmógeno: 89,46 %

7. Cultivos intensamente deshidratados con glicerol filmógeno: 77,89 %

Conclusión: El glicerol filmógeno permanece en la superficie de la epidermis durante un período de tiempo más largo en comparación con el glicerol normal, con mayores efectos osmóticos, y protege las células contra la deshidratación.

Ejemplo 9: Propiedades de cicatrización de heridas en rata de glicerol filmógeno en comparación con glicerol normal

Procedimientos de inducción de lesión experimental:

La piel dorsal de la rata se afeitó y se realizaron 3 lesiones circulares de 0,8 mm de diámetro y profundidad en la hipodermis con un dermatoma. En cada lesión se aplicaron 0,2 ml de cada producto de ensayo durante 7 días consecutivos. El diámetro de la lesión se midió todos los días y se compararon los valores medios.

Producto de ensayo:

Grupo 1: agua destilada; Grupo 2: glicerol solo; Grupo 3: glicerol filmógeno como en el ejemplo N ° 6. (10 ratas en cada grupo).

Resultados:

Tamaño de la lesión (diámetro / día / lesión durante 7 días) en el grupo de agua destilada media = 3,32 cm^2; en el grupo de glicerol = 2,95 cm^2 y en el grupo de glicerol filmógeno = 2,03 cm^2.

Conclusión:

Aunque el glicerol solo sí acelera la curación, la tasa de curación fue mucho más rápida con la aplicación de glicerol filmógeno.

Estabilidad de las preparaciones de glicerol y tanino:

Se realizaron estudios para evaluar la estabilidad de las preparaciones citadas en los ejemplos durante 36 meses de almacenamiento a 30 °C ± 2 °C y A 40 °C ± 2 °C. Las preparaciones fueron estables durante un periodo mínimo de 36 meses.

Interacciones contenido-recipiente:

Las preparaciones citadas en los ejemplos se cargaron en tubos de plástico (PE, PET) y recipientes de aluminio y los contenidos se analizaron a intervalos regulares para evaluar cualquier interacción entre los contenidos y los recipientes. Los análisis de espectrofotometría de infrarrojos de las muestras justo después de la preparación y después de 12 meses de almacenamiento a 37 °C indicaron la ausencia de cualquier interacción entre los contenidos y los recipientes.

Estabilidad durante el uso:

Las muestras de las composiciones citadas en los ejemplos se estudiaron para determinar la descomposición o la contaminación durante el período de uso. Los resultados obtenidos validaron la estabilidad del producto durante el uso durante un periodo de 1-3 meses.

Citotoxicidad:

La citotoxicidad de glicerol filmógeno, evaluada de acuerdo con las normas NF-ISO 10993 mostró que el producto no es citotóxico hasta una concentración de 5 % en el medio de cultivo de células L929.

Hipersensibilidad:

Este estudio se realizó de conformidad con los requisitos de las normas para las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) de la FDA (21 CFR, Parte 58, 1 de abril de 2005) y las Buenas Prácticas de Laboratorio de la OCDE, referencia ENV / MC / CHEM (98) 17 adoptadas por la decisión del Consejo de 26 de noviembre de 1997 usando los ejemplos de las preparaciones N ° 2, 3 y 5.

El producto se inyectó por vía intradérmica, y se aplicó tópicamente directamente sobre la piel de cerdo G. afeitado con un parche, para evaluar la reacción local y la hipersensibilidad retardada. Para comparación se realizó un ensayo idéntico de control negativo con una solución de NaCl al 0,9 % mediante la inyección de la solución por vía intradérmica y por aplicación tópica. Los productos sensibilizaron la piel mediante inyección intradérmica, pero la aplicación tópica no indujo sensibilización.

Toxicidad oral *in vivo*:

Las muestras de glicerol filmógeno como en los ejemplos N° 2, 7, 8 y 20 se administraron a ratas a una dosis de 5 g / kg de peso corporal. El estudio se realizó de acuerdo con las

normas de la BPL. En ausencia de cualquier anomalía, se estimó que la dosis letal aguda era superior a 5 g / kg para todos los productos analizados.

Irritación tópica:

Los estudios se realizaron con ejemplos de la composición del producto de ensayo N ° 2, 7, 9, 10 y 12 de acuerdo con las pruebas de irritación en la piel y ocular BCOP *in vitro* publicados en el diario oficial de la República Francesa, de 21 de febrero de 1982. El principal índice de irritación cutánea fue inferior a 0,50 y los productos se clasificaron como no irritante para la piel. El índice medio de opacidad corneal bovina fue entre 10 y 25 para todos los productos y, por lo tanto, los productos se clasificaron como ligeramente irritantes para los ojos.

Ejemplo 11: Eficacia clínica

Se prepararon diferentes preparaciones de acuerdo con los ejemplos de las composiciones dadas en el texto y la eficacia clínica de las composiciones se evaluó en pacientes que sufren patologías de la piel o la mucosa. Los resúmenes de los estudios se proporcionan a continuación.

Estudio 1: Eficacia terapéutica de glicerol solo frente a filmógeno (Preparación N° 11 del Ejemplo 5 llamado VB-DERM) para el tratamiento de la psoriasis, el eccema y la dermatitis.

Se realizó un ensayo de enmascaramiento sencillo de 6 semanas de duración en 107 pacientes que sufren lesiones cutáneas de

psoriasis, eccema y dermatitis (PED) en el que se comparó la eficacia clínica de la composición según la preparación N° 11 conforme al ejemplo 5 con glicerol solo para el tratamiento de lesiones cutáneas producidas por psoriasis, eccema y dermatitis (PED). Se trató a 56 pacientes con la preparación de glicerol filmógeno VB-DERM (grupo de glicerol filmógeno) y a 51 con glicerol solo (grupo control). El producto se aplicó por vía tópica, dos veces al día durante un periodo de 6 semanas. Las lesiones se clasificaron en una escala de 0 a 4 las semanas 0, 1, 2, 4 y 6.

Durante todo el estudio se observaron resultados muy positivos de la eficacia de la preparación de glicerol filmógeno (VB-DERM) sobre la psoriasis, el eccema y la dermatitis.

El análisis de las puntuaciones registradas a intervalos de tiempo regulares durante un período de 6 semanas demostró claramente que el glicerol filmógeno es mucho más eficaz para el tratamiento de lesiones PED en comparación con glicerol solo (Figs. 3. 4 y 6). La eficacia en la limpieza y cicatrización de la herida del glicerol filmógeno fue estadísticamente significativa ($p < 0,005$) en el tratamiento de todos los síntomas asociados con esas enfermedades: eritema y prurito, edema, sequedad, supuración, formación de escamas y costras, y picor. La calidad de vida según lo evaluado por los investigadores y los pacientes, justo desde la segunda semana después del inicio del tratamiento, también mejoró significativamente (Fig.5).

Estos resultados indican que el glicerol filmógeno permanece sobre la superficie de las lesiones de PED durante un período

de tiempo mucho más largo manteniendo así la lesión limpia de todos los contaminantes libres (células muertas, residuos celulares, enzimas proteolíticas, MMP, citocinas, interleucinas, interferones, virus , bacterias, partículas de polvo) y la restauración de la producción de células de piel normales. Por tanto, el glicerol filmógeno es mucho más altamente activo en comparación con el glicerol no filmógeno para el tratamiento de enfermedades de la piel que implican un crecimiento excesivo de la piel, la presencia de contaminantes en las lesiones, la participación de múltiples impurezas que flotan libremente, tales como células muertas, citocinas, MMP, y otras moléculas de proteína en el sitio de la lesión. Estos contaminantes se eliminan de forma permanente de la lesión, de forma que crean un terreno favorable para el crecimiento normal de la piel.

Estudio 2: Eficacia terapéutica del glicerol solo y glicerol filmógeno (composición como en la preparación n° 10 del ejemplo 5 (HG-VB)) para el tratamiento del herpes genital

Se realizó un estudio piloto abierto, de una sola rama, prospectivo, multicéntrico, para evaluar la eficacia del glicerol filmógeno (HG-VB), en comparación con el glicerol normal estándar, en las mujeres que sufren herpes genital e infección.

Se trató a 60 mujeres con lesiones visibles de herpes genital con HG-VB (10 ml al día) durante 14 días consecutivos. El producto se administró diariamente en la cavidad vaginal y los síntomas de herpes genital se evaluaron antes del tratamiento y los días 1 (2 h), 4, 7, y 14. También se obtuvieron frotis de lesiones genitales para evaluar el

número de células gigantes multinucleadas cargadas con virus usando la prueba de Tzanck. Se trató a 20 mujeres solo con glicerol en condiciones clínicas idénticas.

Resultados: Se observó una reducción estadísticamente significativa del picor vaginal, el enrojecimiento, el dolor, la sequedad, la secreción, la presencia de ampollas, y la normalización del pH vaginal después de transcurridas 2 horas desde la primera aplicación de HG-VB en comparación con el tratamiento con glicerol solo. Los resultados de este estudio demostraron claramente que un glicerol filmógeno continúa drenando el líquido hipotónico procedente de las partes internas de la cavidad vaginal durante un período de 6-8 horas y limpia todos los contaminantes, en comparación con el glicerol solo con una duración más corta (0,5 a 1 h) de acción.

Estudio 3: Eficacia del glicerol solo y el glicerol filmógeno (glicerol asociado con extractos de plantas ricos en PCD como en la preparación nº 9 del ejemplo 5 (HL-VB)) en la eliminación de partículas de virus libres presentes sobre la superficie de las lesiones de herpes labial

Se realizó un estudio piloto abierto, de una sola rama, prospectivo, multicéntrico en 60 pacientes con lesiones de herpes labial abiertas. Se trató a 30 pacientes con glicerol normal y a 30 con HL-VB aplicando unas gotas de los productos, en cada grupo de forma idéntica, dos veces al día durante un periodo máximo de 14 días consecutivos. Los frotis de lesiones labiales se recogieron y se midió la concentración media de virus mediante la cuantificación del número de células gigantes multinucleadas infectadas por

virus en cada lesión usando la prueba Tzank, y se determinó la cantidad media de partículas de virus libres en ambos grupos.

La cantidad media de partículas de virus libres fue> 750, 635 (± 17,51), 542 (± 22,35.), Y 522 (± 13,50) en el grupo tratado con glicerol en comparación con 465 *(± 10,8)*, 359 *(± 6,35)*, 226 *(± 10,22)* y 0,0 los días 1, 4, 7 y 14, respectivamente. Estos resultados indican que HL-VB, es decir, glicerol que contiene PCD o glicerol filmógeno, ejerce sus efectos durante un período de tiempo más largo que el glicerol solo.

Estudio 4: Eficacia del glicerol solo y glicerol asociado con extractos de plantas ricos en PCD, denominado glicerol filmógeno (composición como en la preparación n° 5 del ejemplo 5 (G-PCD)), para abrir la membrana biológica bacteriana que bloquea los orificios de los senos en pacientes que sufren rinosinusitis

Se realizó un ensayo clínico controlado de 21 días de G-PCD de comparación con glicerol solo en pacientes que sufren síntomas agudos de infección en los senos nasales.

El objetivo de este estudio era evaluar la eficacia de la abertura del seno de la solución de G-PCD (32 % de glicerol, 1 % de PCD vegetales en agua) como en el ejemplo N ° 5, en comparación con glicerol solo (32 % de glicerol en agua). Entre 127 pacientes que sufren sinusitis aguda y crónica se seleccionó a 109 fueron para el estudio. Se trató a 58 pacientes con G-PCD y a 51 con glicerol. Los productos se administraron en forma de aerosoles (3 en cada aplicación del

tratamiento), 2-3 veces al día durante un período máximo de 21 días.

Los parámetros estudiados fueron: 1. El efecto sobre la congestión nasal y la rinorrea; 2. El efecto sobre el dolor producido por la presión alrededor de la superficie del seno nasal; 3. El estado general del paciente con respecto a la infección en los senos; y 4. La influencia en la terapia con antibióticos. Los resultados registrados después de 30 minutos, 3 días y 7 días, mostraron una reducción significativamente mayor de los síntomas en el grupo de G-PCD en comparación con el grupo de glicerol para la congestión nasal (-31,02 %, -57,23 % y -73,79 % en comparación con -20,40 %, -19,09 % y -30,25 %), dolor sinusal (-6,91 %, -79,02 % y -85,18 % en comparación con -1,69 %, -8,36 % y -53,36 %), y el estado general de la rinosinusitis (-4,15 %, -69,84 % y -79,89 % en comparación con -22,56 %, +3,52 % y -17,62 %) (Fig.7). La intensidad de la secreción nasal se incrementó en hasta en un 164,79 % en el grupo de G-PCD comparación con sólo el 31,71 % en el grupo de glicerol en los 30 minutos posteriores a la primera administración del producto. Estos resultados indican que G-PCD ejerce una presión osmótica muy alta en comparación con glicerol en condiciones idénticas, lo que lleva a la ruptura de la biopelícula y a la abertura de los senos. Solo el 21 % pacientes en el grupo de G-PCD requirió tratamiento antibiótico durante un promedio de 7,41 días en comparación con el 40 % en el grupo de glicerol durante un período de 10,5 días (Fig. 8).

Estos resultados indican claramente que el glicerol filmógeno permanece sobre la superficie de la mucosa nasal durante un periodo de tiempo más largo en comparación con la solución de

glicerol estándar.

Estudio 5: Comparativa de las propiedades de formación de película y osmóticas de glicerol solo en comparación con glicerol que contiene 1 % de PCD vegetales (composición de glicerol filmógeno como en la preparación n° 2 del ejemplo 5 (Orosol)) sobre lesiones de mucositis oral

Las lesiones de mucositis oral inducida por quimioterapia y radioterapia muestran una mucosa oral muy dañada, con infección y la presencia de sustancias químicas tóxicas en la lesión. Esto causa dolor intenso, sensación de ardor y dificultad para comer. Entre un total de 69 pacientes incluidos en el estudio, 48 fueron tratados con la solución Orosol y 21 con un aerosol de glicerol. El producto se aplicó 4-5 veces al día durante un período de 28 días. El grado de la mucositis en general, la intensidad del dolor y la sensación de ardor, la formación de nuevas úlceras y el efecto sobre el deterioro para comer se evaluaron evaluados antes del tratamiento, 30 minutos después de la primera aplicación del producto y a los 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 y 28 días. se observó una diferencia estadísticamente significativa en la cicatrización de la mucositis en el grupo de Orosol en comparación con el grupo de glicerol (Fig. 9). La duración de la actividad de Orosol fue casi 3 veces mayor en comparación con el glicerol solo en el grupo de control, con un incremento proporcional de los efectos curativos. El glicerol filmógeno atrae líquido hipotónico durante un período de tiempo mucho más largo, limpia la lesión, y ayuda a estimular la recuperación.

Los resultados de estos 5 estudios clínicos demuestran que:

1. El glicerol que contiene PCD vegetal forma una película altamente osmótica y duradera sobre las superficies dañadas y la mucosa en comparación con el glicerol solo.

2. Los efectos de limpieza sobre la superficie dañada son directamente proporcionales a la duración de la retención de la película de glicerol osmótico sobre la lesión.

3. La exudación osmótica de líquido hipotónico elimina todos los contaminantes que flotan libremente, independientemente de la naturaleza del contaminante, debido a las propiedades no farmacológicas pero mecánicas de la película osmóticamente activa.

4. El glicerol filmógeno que contiene PCD es seguro y no irritante.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación para aplicación tópica que comprende glicerol y taninos vegetales, en la que los taninos vegetales tienen la capacidad de unirse al glicerol de modo que el glicerol tenga una cualidad filmogénica.

2. La preparación de la reivindicación 1, en la que los taninos vegetales se eligen de proantocianidinas.

3. La preparación de la reivindicación 2, en la que las proantocianidinas se obtienen de partes de una planta, o de la planta entera, seleccionándose la planta de *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, *saúco negro*, *Camellia sinensis*, *Glycine max*, *Acacia catechu*, *Fraxinus chinensis*, *Gingko biloba*, *Ribes nigrum*, *Tenacetum parthenium*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Opunitia sp.*, *Morus alba*, *Rubus sp.*, *Quercus sp.*, *Pinus sp.*, *Rheum emodi* y combinaciones de las mismas.

4. La preparación de la reivindicación 2, en la que las proantocianidinas se obtienen de partes de una planta, o de la planta entera, seleccionándose la planta de *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium macrocarpon*, *Vitis vinifera*, *saúco negro*, *Camellia sinensis*, *Glycine max* y combinaciones de las mismas.

5. La preparación de la reivindicación 2, en la que las proantocianidinas están sintetizadas.

6. La preparación de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el contenido de glicerol en la preparación está comprendido entre el 30 % y el 99,99 % (v / v).

7. La preparación de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un principio activo.

8. La preparación de la reivindicación 7, en la que el principio activo se selecciona de un fármaco, un antibiótico, un antiséptico, un nutriente, un anticuerpo, un factor de crecimiento o una proteína.

9. Uso de una preparación de las reivindicaciones 1 a 8 para el tratamiento de infecciones de la piel y de las mucosas.

10. Uso de una preparación de las reivindicaciones 1 a 8 para la protección, el transporte, el almacenamiento o la congelación de células, tejidos u órganos.

11. Uso de la reivindicación 19, en la que la concentración neta del glicerol filmógeno en la solución final varía entre el 2 y el 50 % (v/v), preferentemente entre el 10 y el 30 % (v/v) y, más preferentemente, entre el 15 y el 20 % (v/v).

12. Procedimiento para aumentar el tiempo de retención de una película de glicerol por parte de una superficie biológica mediante la preparación de una solución de glicerol y de taninos vegetales que tienen la capacidad de unirse a moléculas de glicerol, y aplicar la solución sobre la superficie biológica.

13. Procedimiento de tratamiento de las infecciones de la piel y de las mucosas, que comprende la etapa de aplicar sobre la zona afectada una preparación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

14. Procedimiento de preparación de glicerol filmógeno, que comprende mezclar glicerol o una solución de de poliol con taninos vegetales que se unen a glicerol.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que los taninos vegetales se añaden como un polvo o un líquido.

RESUMEN

Una preparación para aplicación tópica que comprende glicerol y taninos vegetales, en la que los taninos vegetales tienen la capacidad de unirse al glicerol de modo que el glicerol tenga una cualidad filmogénica.

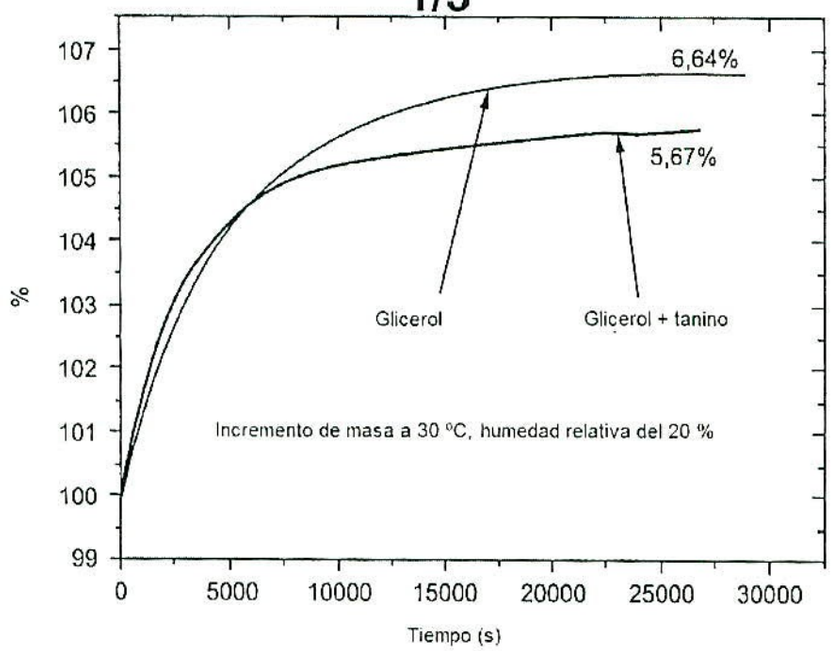

6,64%
5,67%
Glicerol
Glicerol + tanino
Incremento de masa a 30 °C, humedad relativa del 20 %
%
Tiempo (s)
107
106
105
104
103
102
101
100
99
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000

Fig. 1

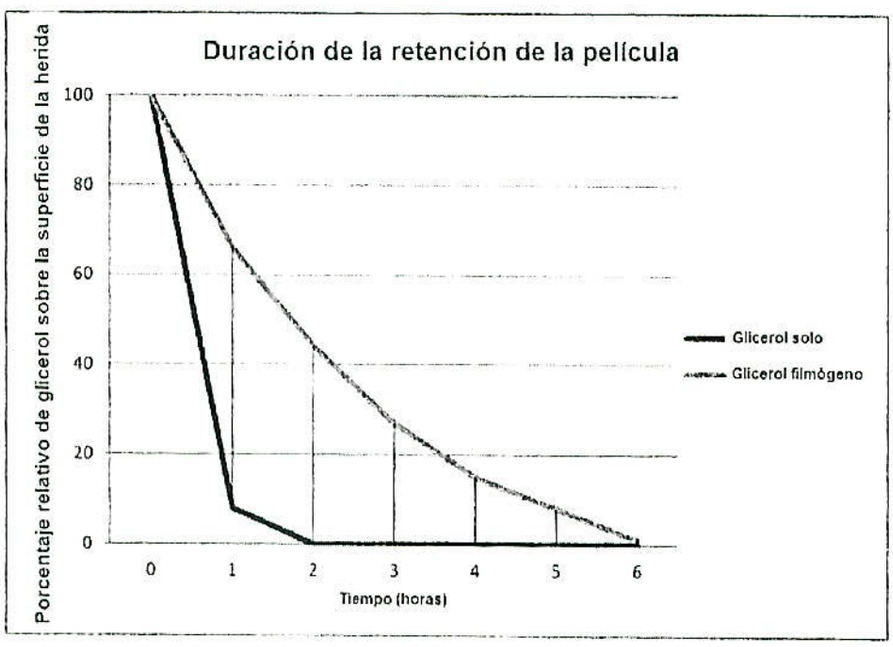
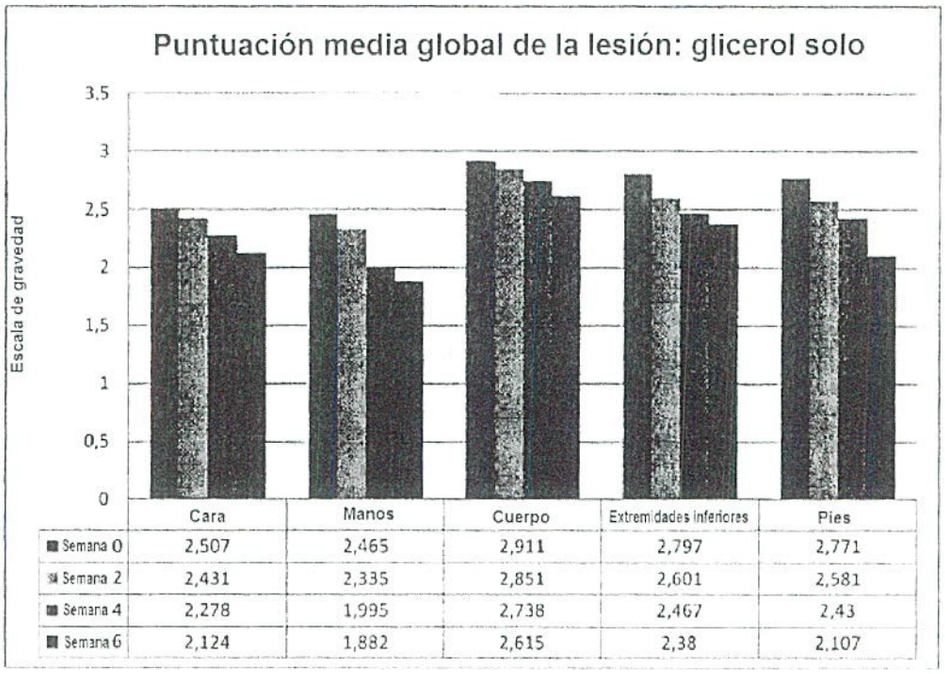

Duración de la retención de la película
Porcentaje relativo de glicerol sobre la superficie de la herida
Tiempo (horas)
Glicerol solo
Glicerol filmógeno
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6

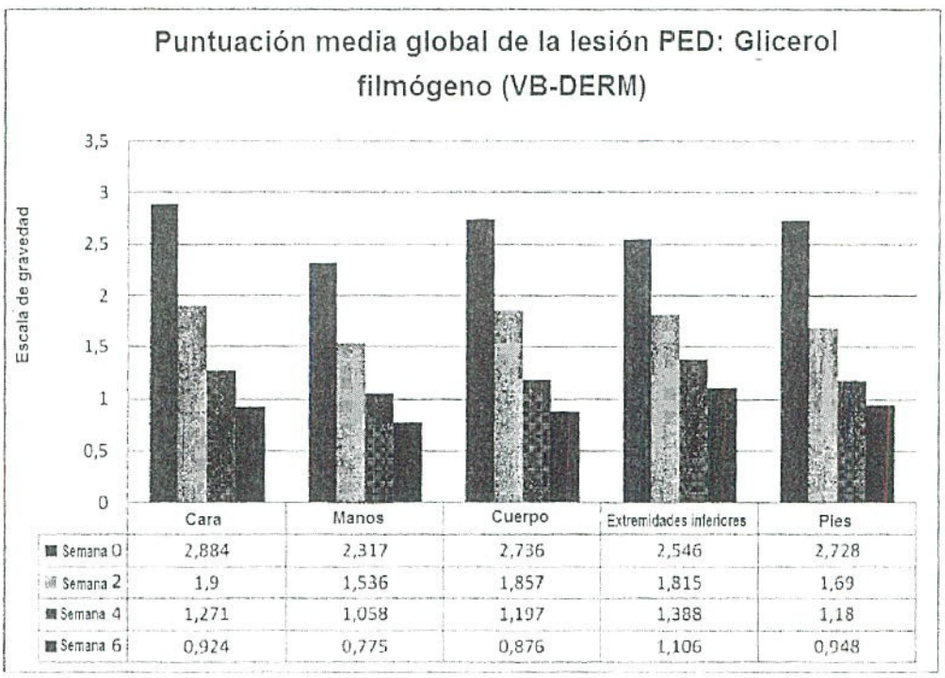
Fig. 2

2/5



	Cara	Manos	Cuerpo	Extremidades inferiores	Pies
Semana 0	2,507	2,465	2,911	2,797	2,771
Semana 2	2,431	2,335	2,851	2,601	2,581
Semana 4	2,278	1,995	2,738	2,467	2,43
Semana 6	2,124	1,882	2,615	2,38	2,107

Fig. 3



	Cara	Manos	Cuerpo	Extremidades inferiores	Pies
Semana 0	2,884	2,317	2,736	2,546	2,728
Semana 2	1,9	1,536	1,857	1,815	1,69
Semana 4	1,271	1,058	1,197	1,388	1,18
Semana 6	0,924	0,775	0,876	1,106	0,948

Fig. 4

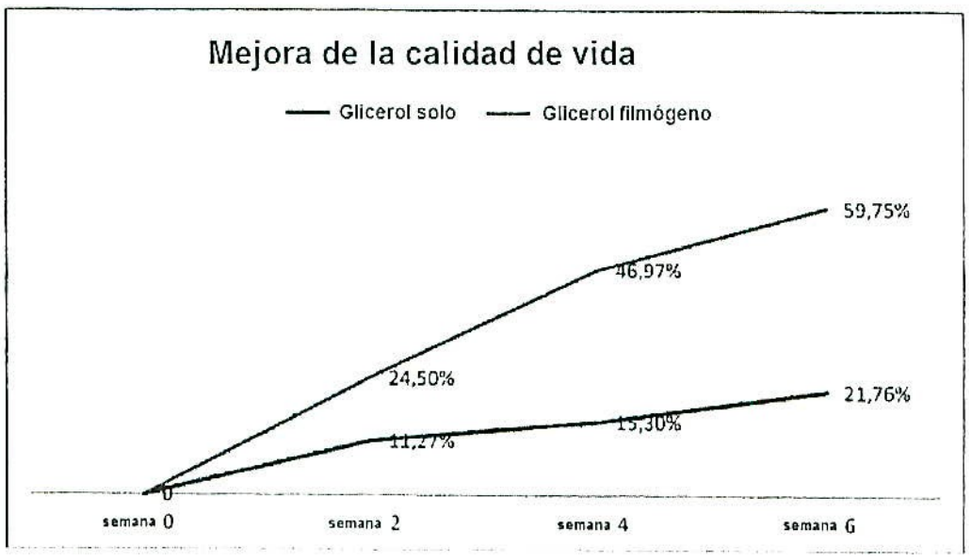

Mejora de la calidad de vida
Glicerol solo
Glicerol filmógeno
59,75%
46,97%
24,50%
21,76%
15,30%
11,27%
0
semana 0
semana 2
semana 4
semana 6

Fig. 5

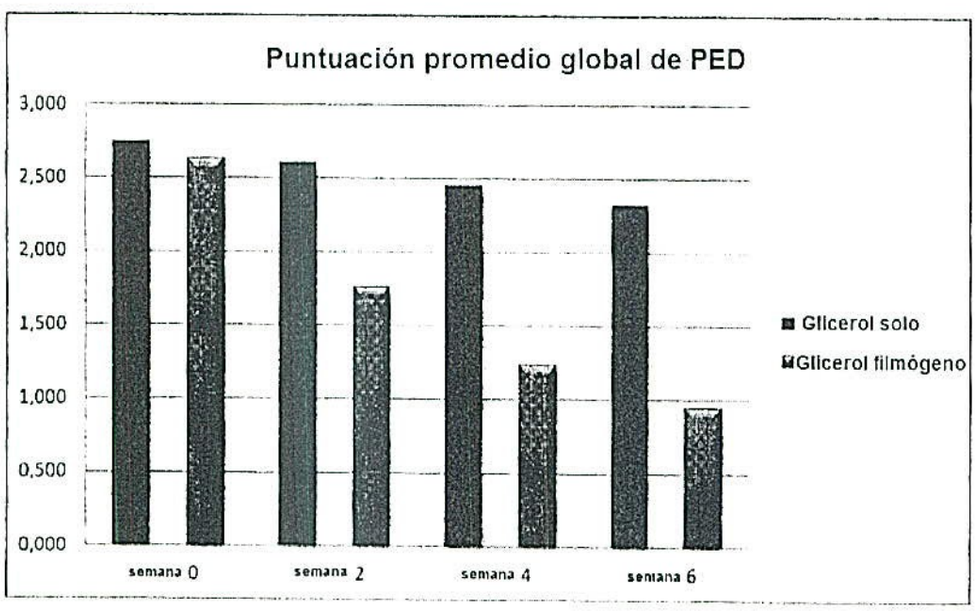

Puntuación promedio global de PED
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
0,500
0,000
semana 0
semana 2
semana 4
semana 6
Glicerol solo
Glicerol filmógeno

Fig. 6

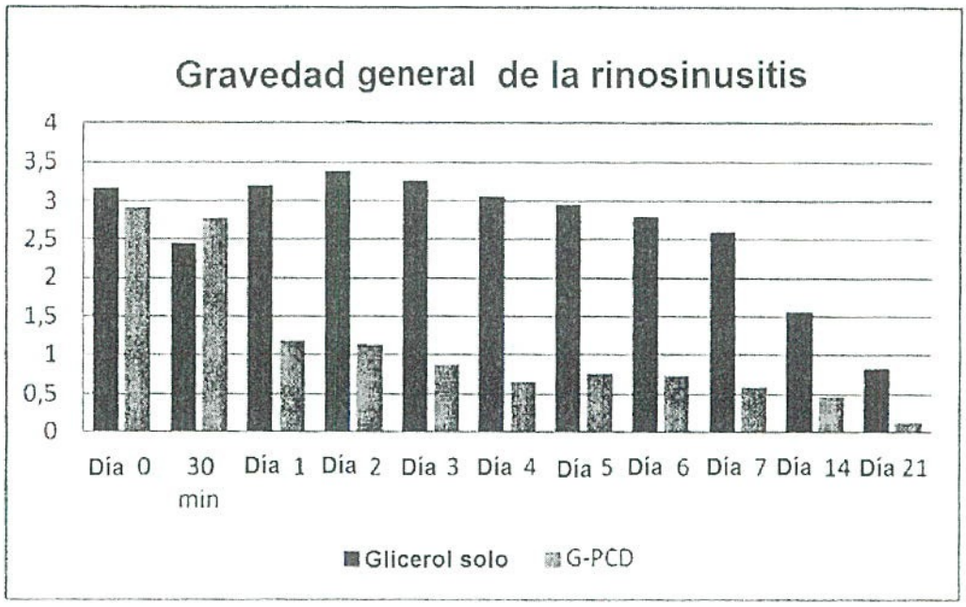

Gravedad general de la rinosinusitis
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Día 0
30 min
Día 1
Día 2
Día 3
Día 4
Día 5
Día 6
Día 7
Día 14
Día 21
Glicerol solo
G-PCD

Fig. 7

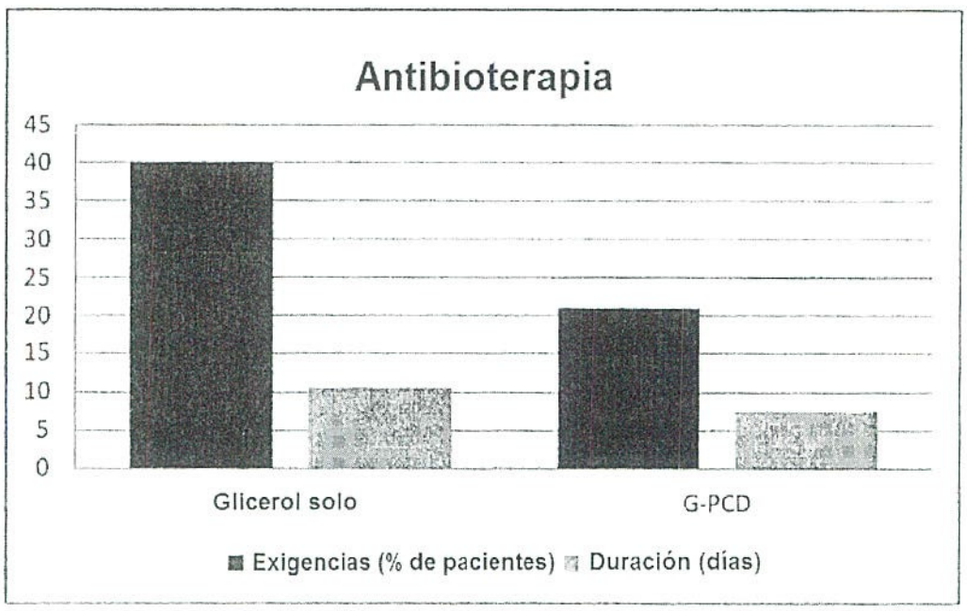

Antibioterapia
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Glicerol solo
G-PCD
Exigencias (% de pacientes)
Duración (días)

Fig. 8

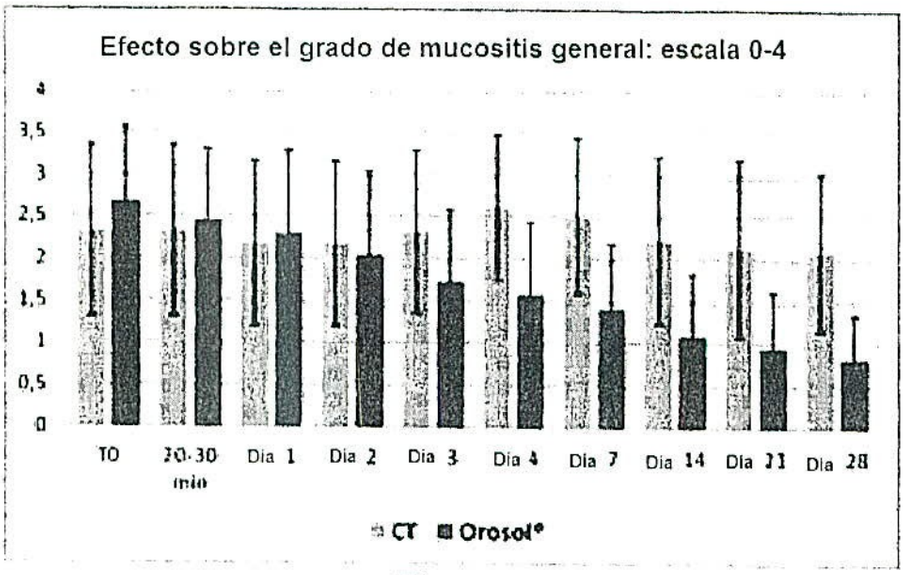

Efecto sobre el grado de mucositis general: escala 0-4
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
T0
30-30 min
Dia 1
Dia 2
Dia 3
Dia 4
Dia 7
Dia 14
Dia 21
Dia 28
CT
Orosol®

Fig. 9

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

57

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☑ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☑ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establec

Completa ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 15-288424- -00000-0000
Fecha: 2015-12-03 13:03:57 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act: 411 PRESENTACION Folios: 58

58

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 131286

Bogotá D.C., Diciembre 03 de 2015 - 12:52:41

RECIBIDO DE : CUESTA & ASOCIADOS LTDA NI 80.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	227097091	02/12/2015	1.226.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	530.000.00	530.000.00
				$530.000.00

SON: **QUINIENTOS TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

-*-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 15-288424- -00000-0000
Fecha: 2015-12-03 13:03:57 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act: 411 PRESENTACION Folios: 58