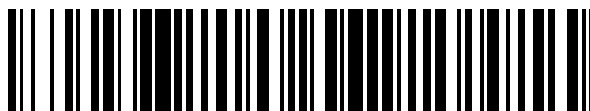


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 498**

51 Int. Cl.:

A61K 36/83 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 17/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2014 PCT/IT2014/000312**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015 WO15079469**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2014 E 14838804 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020 EP 3082836**

54 Título: **Extracto de *Daphne laureola* y su uso para el tratamiento de dermatitis**

30 Prioridad:

27.11.2013 IT RM20130657

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

27.09.2021

73 Titular/es:

**PAOLINO, DONATELLA (25.0%)
Via Archimede 21
95030 Pedara, IT;
FOLINO GALLO, GIOACCHINO (25.0%);
FRESTA, MASSIMO (25.0%) y
SPATARO, LEONE (25.0%)**

72 Inventor/es:

**FOLINO GALLO, GIOACCHINO;
FRESTA, MASSIMO;
SPATARO, LEONE;
VENDITTI, ALESSANDRO y
PAOLINO, DONATELLA**

74 Agente/Representante:

DE ARPE TEJERO, Manuel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 856 498 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Extracto de *Daphne laureola* y su uso para el tratamiento de dermatopatías

Campo de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento de dermatopatías tal como, por ejemplo, la psoriasis y la caspa, mediante tratamiento con un extracto vegetal de *Daphne laureola*. Más en general, la invención se refiere al uso tópico del fitocomplejo extraído de *Daphne laureola* en terapia y para la higiene personal y animal. Dentro del ámbito de la presente invención, por fitocomplejo se entiende la totalidad de las sustancias obtenidas por extracción de plantas que pueden utilizarse en el campo de los productos farmacéuticos, de los productos cosmeceúticos y de los cosméticos. Dentro del ámbito de la presente invención, el término extracto y el término fitocomplejo se consideran sinónimos.

Antecedentes de la técnica

Las dermatopatías son un problema sanitario importante cuya incidencia aumenta constantemente. Las dermatopatías comprenden afecciones cutáneas caracterizadas por hiperproliferación celular, tal como, por ejemplo, psoriasis, caspa, tumores de piel y carcinoma queratinocítico intraepidérmico.

Las más frecuentes entre las dermatopatías son la psoriasis y la dermatitis, tales como, por ejemplo:

Dermatitis atópica: habitualmente de origen psicossomático.

Dermatitis de contacto: Es una reacción del cuerpo a alérgenos específicos con los que entra en contacto. Se manifiesta con eritema, costras y descamación de la piel.

Dermatitis seborreica: este tipo implica principalmente áreas corporales más propensas a la secreción de sebo, tal como, por ejemplo, el cuero cabelludo.

Dermatitis crónica: es una reacción inflamatoria con activación del sistema inmunitario que implica a la piel y se manifiesta inicialmente como una irritación que se extiende a distintas partes del cuerpo y tiene una evolución crónica, del tipo recurrente.

Dermatitis inespecífica: puede ser ocasional y se manifiesta con eritema y/o descamación, posiblemente con prurito, que no se puede relacionar con causas patológicas precisas.

La psoriasis es una patología muy extendida y es uno de los tipos más comunes de dermatitis crónica, que afecta a la piel y, en particular, el estrato córneo. Desde el punto de vista etiopatológico es una reacción inflamatoria con activación del sistema inmunitario que afecta a la piel y se manifiesta inicialmente como una irritación que se extiende a distintas partes del cuerpo. La psoriasis no es una patología infecciosa, pero generalmente se manifiesta con un progreso crónico de tipo recurrente. Se caracteriza por la aparición de manchas rojas y descamantes que se localizan en algunas partes del cuerpo tal como los codos, palmas de las manos, rodillas, plantas de los pies y cuero cabelludo.

Se estima que la prevalencia de psoriasis en la población general está entre el 1 y el 3 %, en general, un tercio de los pacientes presenta la primera aparición de psoriasis ya durante la infancia o la adolescencia.

La causa de la psoriasis aún se desconoce y los datos disponibles parecen apuntar a un origen multifactorial; los factores genéticos y ambientales están, de hecho, implicados en la aparición y evolución de esta patología.

La psoriasis puede considerarse una enfermedad hereditaria con antecedentes familiares.

La psoriasis se presenta con una sintomatología variada. Esta patología puede, de hecho, presentarse como:

Psoriasis en placas: el tipo más común desde el punto de vista clínico; la lesión típica es una placa eritematosa bien definida cubierta de escamas descamativas plateadas, similares a la mica. Las placas individuales pueden tener distintos diámetros y pueden unirse, cubriendo áreas de todo el cuerpo.

Psoriasis en gotas: se presenta en sujetos jóvenes después de una infección amigdalina estreptocócica. Aparecen en la piel, principalmente en el tronco del cuerpo, pápulas de 1 mm a 1 cm que tienen el aspecto de gotas de lluvia.

Psoriasis pustulosa: este tipo puede producirse con un carácter localizado o generalizado; en particular, el primero se produce principalmente en las palmas de las manos y en las plantas de los pies. En este caso aparecen pequeñas vesículas subcorneales que salen a la superficie y se descaman.

Psoriasis eritrodérmica: este es un tipo grave de psoriasis en que toda la superficie de la piel se vuelve eritematosa y descamada. Este tipo puede estar provocado por fármacos, estrés, enfermedades concurrentes.

Psoriasis seborreica: un tipo muy común también llamado sebopsoriasis o seboriasis. Se caracteriza por lesiones que son muy similares a la dermatitis seborreica, pero puede implicar a áreas que normalmente no están implicadas.

Psoriasis amiantácea: es un tipo que solo implica al cuero cabelludo. Habitualmente es una afección juvenil.

Las lesiones psoriásicas habitualmente aparecen desde el punto de vista histológico como áreas hiperproliferativas,

con una renovación epidérmica aumentada 10 veces con respecto a la piel normal, con una maduración incompleta de los queratinocitos y núcleos retenidos en el estrato córneo (paraqueratosis), con procesos de neovascularización, aumento del flujo sanguíneo, exudados proteicos y vasos linfáticos inmaduros. La aparición de placas psoriásicas en la superficie de la piel también está relacionada con la infiltración de neutrófilos polimorfos en la epidermis. Además, la piel sana en los pacientes psoriásicos presenta modificaciones estructurales y en estos sujetos la evolución de la patología tiene una progresión favorable tras haberse producido un acontecimiento traumático (fenómeno de Koebner). Además, los sujetos psoriásicos tienen ciclos de renovación más intensos con respecto a los no afectados por esta patología y muestran una síntesis aumentada de ADN celular y niveles más altos de glucógeno en las lesiones con respecto a la piel de sujetos no psoriásicos.

Este efecto parece estar relacionado con la modificación funcional del sistema inmunitario celular (linfocitos T) y de la respuesta epidérmica a citocinas que desempeñan un papel fundamental en la génesis y progresión de esta enfermedad.

Las citocinas son moléculas proteicas producidas por distintos tipos celulares y secretadas en el medio circundante, habitualmente en respuesta a un estímulo específico; tienen la capacidad de modular el comportamiento de distintas células estimulando su crecimiento, diferenciación y muerte. Habitualmente, su acción es local, pero en ocasiones tienen un efecto beneficioso en todo el cuerpo. Las interleucinas tienen un papel etiopatógeno en distintas enfermedades que se han descubierto en los últimos años; de hecho, los linfocitos T que producen las interleucinas de tipo 1, 6 y 8 tienen un papel importante en la patogenia de la psoriasis. En particular, la interleucina 6 (IL-6) es una citocina pleiotrópica producida por muchos tipos celulares, entre los que se encuentran los monocitos/macrófagos, los fibroblastos, las células endoteliales, los queratinocitos, los linfocitos T, los linfocitos B, los neutrófilos.

Las terapias actuales para las dermatopatías en general y para la psoriasis en particular proporcionan enfoques biomédicos que incluyen como fármacos de primera línea dentro de los tipos de extensión limitada preparaciones emolientes tópicas tales como la vaselina, formulaciones de cortisona y/o agentes reductores (alquitrán o ditranol), agentes queratolíticos (ácido salicílico y/o urea) y análogos de vitamina D. En el caso de los tipos generalizados de psoriasis, en ocasiones se utilizan terapias sistémicas tales como fototerapia con UVB o UVA y psoralenos (fotoquimioterapia o terapia con PUVA (forma siglada de (*psoralens with ultraviolet A light*, psoralenos y rayos ultravioleta A)), uso de retinoides (acitretina y etretinato) o ciclosporina A.

Recientemente se han introducido fármacos biológicos como los anticuerpos monoclonales, citocinas (interferones e interleucinas), proteínas de fusión y factores de crecimiento tisular.

Daphne laureola L., (en italiano: *dafne laurella*), es una especie de *Daphne*, en la familia *Thymelaeaceae*. Es una planta de hoja perenne con flores de color verde amarillentas que maduran en bayas negras al fines del verano. *D. laureola L.* (DL) puede tener una altura de 50 a 150 cm. La corteza es fina y gris amarillenta cuando madura, mientras que las ramas tiernas son verdes. Las hojas insertadas alternas habitualmente forman espirales gruesas hacia la parte superior de los retoños, pero también puede cubrir ramas enteras. Las hojas son lanceoladas u obovales-lanceoladas, de 2-13 cm de largo y de 1-3 cm de ancho. Son glabras, verde oscuras, brillantes en la cara superior y más brillantes en la cara inferior. Crece tanto al sol como a la sombra y se adapta fácilmente al sotobosque templado. La reproducción puede ser tanto por semilla como por brotes radicales.

Se conoce en la técnica anterior (documento CN 101181427) la acción antipsoriásica de extractos obtenidos de una combinación o de distintas plantas. Entre los distintos componentes de esta mezcla se puede encontrar a *Daphne genkwa* (DG), una planta de Asia, y perteneciente a la misma familia que DL, pero, a diferencia de DL que es de hoja perenne, esta planta es de hoja caduca. Además, se distingue de DL por sus flores de un inusual azul lila con tonalidades amatistas.

Además, se conoce por una solicitud de patente muy antigua (documento GB 479688, fechada en 1936) el uso de DL para el tratamiento del eccema en animales. De todos modos, se describe el uso de las hojas, simplemente secas o marchitas, para ser mezcladas con pienso animal, apuntando así a un uso oral. Este enfoque no es aplicable al uso en seres humanos dado que DL y otras especies de *Daphe* resultan tóxicas si se ingieren, por lo que no es aconsejable su uso oral en seres humanos ("Natural remedies and Nutraceuticals Used in Etfnoveterinary Practices in Inland Southern Italy" - Pieroni y col.).

La ingestión de *Daphne* tiene consecuencias muy graves y puede ser letal según lo informado por y col. en "Isolation and structure of daphnetoxin, the poisonous principle of *Daphne* species".

Por tanto, se tuvo la necesidad de un producto que pudiera utilizarse por vía tópica y que pudiera tener una eficacia aumentada con respecto a la técnica anterior en dermatopatías en general, y en particular, en tumores de la piel y psoriasis, y que pudiera ser útil no solo en el campo farmacéutico, sino también para la higiene personal en todas las enfermedades de la piel relacionadas con las dermatopatías.

Sumario de la invención

La presente invención propone la aplicación tópica de un extracto de DL para el tratamiento de dermatopatías en general y de la psoriasis en particular. Se comparó *in vitro* el extracto de DL con el de *Daphne genkwa* (DG). Estas

dos plantas tienen un origen y distribución geográfica distintos, se distinguen por características distintas, DL es de hoja perenne, DG es una planta de hoja caduca y también se distingue por sus flores de un inusual azul lila con tonalidades amatistas.

Al comparar estas dos plantas, DL pareció ser inesperadamente más eficaz.

5 La presente invención proporciona una alternativa natural válida a las terapias actuales, que lamentablemente hoy en día no son satisfactorias, en particular para la psoriasis. Por lo tanto, es un objeto de la presente invención un extracto obtenido de *Daphne laureola* para utilizarlo en los campos de los productos farmacéuticos, de los cosméticos y de los productos cosmeceúticos.

10 Los extractos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con distintos principios activos conocidos por el experto en la materia. Formulados para el uso tópico, tienen la capacidad de mejorar eficaz y rápidamente las dermatopatías, sin necesidad de administración oral y sin efectos secundarios.

Un objeto adicional de la invención son composiciones farmacéuticas, cosméticas y cosmeceúticas que comprenden el fitocomplejo obtenido por extracción de *Daphne laureola*.

15 Otro objeto adicional de la invención es un procedimiento para el tratamiento farmacéutico, cosmético y cosmeceútico de dermatopatías en general, y de psoriasis en particular, que comprende la aplicación tópica de cantidades eficaces del fitocomplejo obtenido por extracción de *Daphne laureola*.

20 Otro objeto adicional de la presente invención es el uso del fitocomplejo obtenido por extracción de *Daphne laureola* en el campo de los productos farmacéuticos, de los cosméticos y de los productos cosmeceúticos para el tratamiento de dermatopatías en general y de psoriasis en particular, mediante la aplicación tópica de cantidades eficaces de dicho fitocomplejo. El uso del fitocomplejo también es conveniente para el tratamiento de dermatopatías caracterizadas por hiperproliferación celular, tal como, por ejemplo, psoriasis, caspa, tumores de piel y carcinoma queratinocítico intraepidérmico.

25 Son objetos adicionales de la presente invención kits farmacéuticos, cosméticos y cosmeceúticos, que comprenden al menos un producto, preferentemente al menos dos productos que contengan el fitocomplejo o el extracto de la invención que lo contenga, elegidos de: champú, leche limpiadora, tónico acuoso, solución acuosa, solución alcohólica, solución hidroalcohólica, máscara, emulsión, gel a base de agua, lipogel, aceite facial y corporal, parches medicinales.

Otros objetos resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de las figuras

30 **Figura 1:** Estimulación de queratinocitos humanos (células NCTC2544) con IL-6 (0,1 y 0,7 µg/ml): A) Porcentaje de proliferación; B) Número de células. Cada experimento es el promedio de tres evaluaciones distintas ± desviación típica;

35 **Figura 2:** Evaluación toxicológica a las 24 h de un extracto de DL en queratinocitos humanos (células NCTC2544) mediante ensayo de MTT: A) Porcentaje de viabilidad celular; B) Número de células. Cada experimento es el promedio de tres evaluaciones distintas ± desviación típica;

Figura 3: Evaluación toxicológica a las 72 h de un extracto de DL en queratinocitos humanos (células NCTC2544) mediante ensayo de MTT: A) Porcentaje de viabilidad celular; B) Número de células. Cada experimento es el promedio de tres evaluaciones distintas ± desviación típica;

40 **Figura 4:** Evaluación de la actividad antipsoriásica *in vitro* después de 48 horas de tratamiento con decocciones de DL y DG y extractos obtenidos por maceración de DL en un modelo de psoriasis de células NCTC2544: a) Inhibición del crecimiento celular; b) Número de células. Cada experimento es el promedio de tres evaluaciones distintas ± desviación típica;

Figura 5: Distribución corporal de las placas psoriásicas al inicio del tratamiento en un sujeto que padece psoriasis (B.R.): A) frente, B) parte posterior, C) ampliación frontal;

45 **Figura 6:** Regresión de las placas psoriásicas en el mismo sujeto de la Figura 5, después de la aplicación diaria de una solución de decocción: A) ampliación frontal, B) frente;

Figura 7: Placas psoriásicas antes (A) y después (B) de la aplicación diaria de la mezcla glicérica.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se define en las reivindicaciones. Los extractos que contienen el fitocomplejo de DL de acuerdo con la invención se obtienen de plantas, preferentemente que no se encuentren floreciendo. Los extractos se obtienen preferentemente de las hojas, de todos modos, se puede utilizar todas las partes de la planta: flores, frutos, hojas, tallo y raíces, tanto frescos como secos. Después de la cosecha, las muestras se pueden utilizar frescas, habitualmente después de haberlas enjuagado, o se pueden secar en una estufa (por ejemplo, una estufa ventilada a 22 °C, hasta que estén completamente deshidratadas).

55 Los extractos de la invención pueden prepararse de acuerdo con los procedimientos tradicionalmente utilizados en el campo de la extracción de productos naturales conocidos por el experto en la materia, tal como, por ejemplo, se

describe en "Botanicals, a Phytocosmetic Desk Reference" Frank S. D'Amelio, CRC Press, pág. 39-48.

Los disolventes que preferentemente deberían utilizarse para llevar a cabo la extracción son los disolventes habitualmente empleados en el campo de las hierbas medicinales, tal como, por ejemplo, disolventes polares, por ejemplo, elegido del grupo que comprende: agua, etanol, glicerol, propanol, butanol, acetona, glicoles tales como etilen-, propilen- y butilen-glicoles, acetato de etilo, hexano, cloruro de metileno, metanol, distintos éteres y las mezclas correspondientes, Particularmente preferidos son el agua o una mezcla disolventes de etanol y agua en cualquier proporción.

Las técnicas de extracción por infusión, decocción y maceración se describen a continuación en el presente documento.

10 **Infusión** es la técnica de extracción más sencilla y rápida. Proporciona el remojo de la sustancia farmacéutica (hojas y/u otras partes de la planta, frescas o secas) en agua previamente hervida durante un período que varía de 10 minutos a aproximadamente 30 minutos en un recipiente preferentemente cubierto o sellado. Después del tiempo prefijado, dependiendo de la consistencia de los tejidos vegetales utilizados, más corto para las flores, las hojas tiernas y las puntas de plantas finamente cortadas como para tisanas, un poco más para las partes más duras y resistentes, la preparación se filtra presionando ligeramente el residuo: la solución así obtenida es la infusión que contiene el fitocomplejo.

Se prepara una **decocción** remojando la sustancia farmacéutica en agua fría y llevándolo a ebullición, en un recipiente preferentemente tapado o sellado, durante un tiempo que varía de 10 a 60 min. Después se filtra y prensa ligeramente el residuo y la solución así obtenida es la decocción que contiene el fitocomplejo.

20 Se obtiene un **extracto por maceración** de la planta fresca remojando la sustancia farmacéutica en una solución alcohólica o hidroalcohólica, habitualmente durante 24 h o más.

La infusión, la decocción y el extracto por maceración se pueden concentrar a continuación por evaporación o liofilización de la solución, para obtener extractos muy, o menos, concentrados, o secos, de acuerdo con la cantidad de disolvente residual.

25 El extracto puede utilizarse tal cual o puede someterse a distintos grados de concentración a sequedad para obtener un extracto líquido, semilíquido o seco. La sequedad se puede lograr mediante procedimientos tradicionalmente utilizados en este campo, tal como, por ejemplo, evaporación a presión reducida, secado por pulverización y liofilización. Los extractos pueden tener una concentración tal que a 1 gramo de extracto le corresponda de 1 a 1,5 gramos de sustancia farmacéutica fresca.

30 Los **extractos secos** representan la forma más concentrada del fitocomplejo y habitualmente están en forma de polvo deshidratado, de forma que sean más estables y puedan reconstituirse añadiendo agua u otro disolvente adecuado para el uso de acuerdo con la invención, tal como, por ejemplo, etanol.

35 El extracto fabricado como se describe anteriormente, que contiene el fitocomplejo de DL, puede utilizarse como principio activo, solo o en combinación con otros principios activos para preparar composiciones para su uso tanto en el campo médico como en el no médico.

Las formulaciones se pueden elegir entre, pero sin limitación: champú, leche limpiadora, tónico acuoso, solución acuosa, solución alcohólica, solución hidroalcohólica, máscara, emulsión, gel a base de agua, lipogel, aceite facial y corporal, parches medicinales que contienen una cantidad de fitocomplejo del 1 % al 90 %.

40 Otros principios activos que pueden utilizarse se eligen entre los comúnmente utilizados en el campo de los productos farmacéuticos, de los productos cosmeceúticos y de los cosméticos, por ejemplo: antioxidantes, aceites esenciales, vitaminas, filtros UV, colágeno, elastina.

45 Las composiciones han de utilizarse para administración tópica en forma de formulaciones líquidas, tal como, por ejemplo, geles, lociones, leches, emulsiones, espumas y similares; formulaciones sólidas o semisólidas, tales como cremas, pomadas, barras y similares. Dichas formulaciones pueden prepararse de acuerdo con procedimientos convencionales, por ejemplo, como se describe en "Remington's Pharmaceutical Handbook", Mack Publishing Co., NY, EE.UU., en "Botanicals, a Phytocosmetic Desk Reference" Frank S. D'Amelio, CRC Press, pág. 299-305, junto con otros componentes farmacéuticamente, cosmeceúticamente y cosméticamente aceptados, tales como emolientes, humectantes, espesantes, emulsionantes, colorantes, detergentes, desinfectantes, antioxidantes, tampones, agentes para opacar, agentes exfoliantes, aromas y similares, aceites esenciales, vitaminas, filtros UV, colágeno, elastina y mezclas de los mismos.

50 En los Ejemplos se proporcionan ejemplos de composiciones y se informan brevemente a continuación en el presente documento:

- Leche limpiadora que contiene del 0,1 al 5 % de extracto seco;
- Emulsión que contiene del 0,5 al 10 % de extracto seco;

- Gel a base de agua que contiene del 5 al 20 % de extracto seco;
- Solución acuosa que contiene del 0,5 al 20 % de extracto seco;
- Parche medicinal que contiene del 5 al 2 % de extracto seco;
- Champú que contiene del 0,5 al 10 % de extracto seco.

5 Los extractos de la invención se utilizan ventajosamente como aislados no purificados, manteniendo sustancialmente intacta su complejidad biológica.

10 Los extractos y las correspondientes composiciones farmacéuticas, cosméticas y cosmeceúticas de la invención demostraron ser particularmente eficaces en la prevención y en el tratamiento de dermatopatías en general, entre las que los tipos más frecuentes son la dermatitis, tal como dermatitis atópica, dermatitis de contacto, dermatitis seborreica, dermatitis crónica y dermatitis inespecífica; caspa; carcinoma queratinocítico intraepidérmico; tumores de piel tales como melanomas, carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular o epidermoide; y la psoriasis en sus distintas formas, tal como la psoriasis en placas, psoriasis gotosa, psoriasis pustular, psoriasis eritrodérmica, psoriasis seborreica y psoriasis amiantácea.

15 En estas patologías están implicadas todas las partes del cuerpo, en particular, las manchas rojas y descamantes se localizan en partes tales como los codos, palmas de las manos, rodillas, plantas de los pies, y cuero cabelludo.

Los sujetos afectados también pueden ser lactantes o adolescentes y este tipo de patologías también se presenta en animales.

20 Los extractos de DL de acuerdo con la invención pueden aplicarse solos o en combinación con preparaciones emolientes tópicas tales como vaselina, formulaciones de cortisona y/o agentes reductores (alquitrán y ditranol), agentes queratolíticos (ácido salicílico y/o urea) y análogos de vitamina D; terapias sistémicas tales como fototerapia de UVB o fototerapia de UVA con psoralenos (fotoquimioterapia o terapia con PUVA), uso de retinoides (acitretina y etretinato) o ciclosporina A; anticuerpos monoclonales, citocinas (interferones e interleucinas), proteínas de fusión y factores de crecimiento tisular.

25 La conveniencia de la presente invención se debe no solo a la eficacia particular del fitocomplejo de *Daphne laureola*, sino también al hecho de que la acción terapéutica se ejerce a nivel tópico, sin administración oral. Además, una ventaja importante, como lo demuestra la observación experimental de los inventores, la patología no parece volver a manifestarse durante al menos seis meses después de la suspensión del tratamiento. Otra ventaja se encuentra en la mayor eficacia farmacológica de *Daphne laureola* con respecto a las otras plantas del género *Daphne*.

30 La presente invención se describirá en el presente documento con referencia a los siguientes ejemplos, que no deben considerarse como limitantes del ámbito de la invención.

PARTE EXPERIMENTAL

PREPARACIÓN DE LA DECOCCIÓN

35 La DL y las decocciones se prepararon remojando las hojas de la planta fresca en agua al 5 % p/v (50 g de hojas frescas en 1000 ml de agua), llevando a ebullición durante aproximadamente dos horas hasta que el volumen se redujo a la mitad. La decocción se dejó enfriar y luego se filtró.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS POR MACERACIÓN

40 El extracto se obtuvo de la planta fresca mediante maceración a temperatura ambiente durante 24-48 h en etanol al 96 % (200 gramos de planta fresca por 1 litro de disolvente) (disolvente solubilizante de amplio espectro para compuestos polares y no polares), extrayendo tres veces el material vegetal (extracción completa) y agrupando los extractos en un extracto total después de eliminar el disolvente de extracción. Se eligió etanol al 96 % como disolvente para extraer todas las clases de componentes secundarios presentes en la matriz vegetal.

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIPSORIÁSICA

45 La evaluación *in vitro* de la actividad antipsoriásica se llevó a cabo en queratinocitos humanos (NCTC2544), (Emilia and Lombardia Experimental Zooprophyllactic Institute). Las NCTC2544 se sembraron en placas de Petri (diámetro de 100 mm) y se incubaron utilizando medio de cultivo D-MEM (GIBCO, Invitrogen Corporation, Reino Unido), con penicilina (50 U/ml), estreptomycin (50 µg/ml), aminoácidos no esenciales, anfotericina B (50 µg/ml) y suero fetal bovino (SFB) al 10 % v/v. La incubación se llevó a cabo en una incubadora de células a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las células se cultivaron durante tres días para permitir que el modelo celular alcanzara el 80 % de confluencia. Después de tres días de incubación, las células se desprendieron de las placas de Petri utilizando 1 ml de tripsina/EDTA y se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 ml. Se utilizaron 2 ml de medio de cultivo para neutralizar los queratinocitos humanos. Las placas de Petri se lavaron con 2 ml de tampón fosfato (PBS), sin calcio y magnesio, que luego se transfirieron a los tubos de centrifuga. La suspensión celular así obtenida se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente utilizando una centrifuga Megafuge 1.0 (Heraeus Sepatech, Osterode/Harz,

Alemania). El sedimento celular obtenido se resuspendió en 6 ml de medio de cultivo para obtener una suspensión celular a una concentración final de 1×10^6 células/ml. A continuación, se sembraron 200 μ l de una suspensión celular de 2500 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h a 37 °C con CO₂ al 5 % para permitir la adhesión.

- 5 El modelo experimental para evaluar la actividad antipsoriásica se desarrolló estimulando fibroblastos con interleucina 6 (IL-6). La IL-6 se produjo en cultivos de células bacterianas y el sistema se purificó utilizando un procedimiento ya descrito en la bibliografía (Arcone y col., 1991). Se trataron células NCTC2544 durante 48 h con una concentración de IL-6 de 0,7 μ g/ml a 37 °C con CO₂ al 5 %. Después de 48 h de incubación, las células NCTC2544 se trataron con concentraciones crecientes de decocción previamente liofilizada (al 0,01, 0,1, 1, 10 % p/v) durante 48 y 96 h. Como control interno, se utilizó un cultivo de queratinocitos humanos no tratados a la misma concentración que la utilizada para desarrollar el modelo experimental. En el caso de DL también se evaluó la actividad antipsoriásica del extracto alcohólico obtenido por maceración. La actividad antipsoriásica *in vitro* de las formulaciones se midió mediante el ensayo de MTT. En particular, las células NCTC2544 contenidas en los distintos pocillos se trataron con 10 μ l de una solución de sales de tetrazolio solubilizadas en PBS y se incubaron durante 4 h a 37 °C, a CO₂ al 5 %. Después de 4 h de incubación, los cristales de formazán precipitados en el fondo de los pocillos se solubilizaron con 200 μ l de una solución de etanol/dimetilsulfóxido y se midió la disminución de la proliferación como viabilidad celular, midiendo espectrofotométricamente la concentración celular a una λ de excitación de 540 nm y una λ de emisión de 690 nm. La disminución de la proliferación se correlacionó con la cantidad de cristales de formazán obtenidos, que es directamente proporcional a la absorbancia de las células.
- 20 La disminución del porcentaje de proliferación se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de disminución} = (\text{AbsT}/\text{AbsU}) \times 100;$$

en que AbsT es la absorbancia de las células tratadas y AbsU es la absorbancia de las células no tratadas. El porcentaje de aumento en la proliferación celular obtenido es el promedio de tres evaluaciones distintas \pm desviación típica.

- 25 Los ensayos de evaluación *in vitro* se llevaron a cabo midiendo la disminución del número de células después de los tratamientos con la decocción o el extracto obtenido por maceración a distintas concentraciones porcentuales.

Los resultados experimentales obtenidos demostraron que el efecto sobre la inhibición del crecimiento producido por las soluciones de extracto de maceración y decocción de DL es dependiente del tiempo y de la dosis. El tratamiento de las células NCTC2544 estimuladas con IL-6 a 0,7 μ g/ml durante 48 h, induce una disminución del crecimiento del 50 % con la decocción y del 52 % con el extracto de maceración, después de 48 h de tratamiento a una concentración de 0,1 % v/v. Los resultados obtenidos en términos de reducción del porcentaje de crecimiento son más evidentes aumentando el porcentaje de extracto de decocción o maceración utilizado, 35 y 33 para la concentración del 1 %, y 25 y 26 para la concentración del 10 % v/v (Figura 4a). Es probable que este efecto dependiente de la dosis se produzca por una mayor cantidad de fitocomplejo capaz de interactuar con el modelo experimental de psoriasis, lo que tiene lugar cuando aumenta el porcentaje de extracto de decocción o maceración utilizado para el tratamiento.

Se obtuvo un resultado similar al obtenido para el porcentaje de inhibición del crecimiento al expresar la actividad antipsoriásica de la decocción en función del número de células. En este caso, el número de queratinocitos NCTC2544 disminuyó de 14499 células (muestra de control) a 6233, 1344 y 787 células/0,1 ml (muestras tratadas, respectivamente, con soluciones de decocción al 0,1, 1 y 10 % v/v).

La decocción de DL se comparó con una decocción de DG preparada siguiendo el mismo procedimiento y utilizada en las mismas condiciones. En todas las concentraciones y en todos los tiempos de exposición, el extracto de DL mostró un efecto significativamente mayor con respecto a la decocción de DG. De hecho, DL a la concentración del 0,1 % de solución de decocción mostró un porcentaje de inhibición del crecimiento de queratinocitos de más del doble con respecto a DG. Por este motivo la siguiente experimentación *in vivo* se llevó a cabo solo con la decocción de DL.

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA TOXICIDAD DE LA DECOCCIÓN DE DL

La toxicidad de la decocción de DL se evaluó después de 24, 48 y 72 h de incubación en función del porcentaje de producto v/v utilizado. Se sometieron a ensayo concentraciones crecientes de decocción previamente liofilizadas (el 0,01, 0,1, 1, 10 % p/v) utilizando el ensayo de MTT descrito anteriormente. La toxicidad del compuesto se evaluó en función del porcentaje de viabilidad. Los valores obtenidos son el promedio de seis experimentos distintos \pm desviación típica.

Los datos experimentales ilustrados en la Figura 2 muestran que la integridad estructural y funcional de las NCTC2544, expresado como viabilidad celular, está por encima del 94 % en todas las concentraciones de extracto de decocción utilizadas (el 0,01, 0,1, 1 y 10 % v/v) después de 24 h de tratamiento. Al aumentar el porcentaje de decocción del 0,01 al 10 % v/v se observaron diferencias no significativas en términos variaciones de viabilidad celular (Figura 2a), posiblemente debido a que los componentes del fitocomplejo extraídos de la matriz vegetal no

activan mecanismos capaces de inducir reacciones adversas en los queratinocitos humanos y son completamente biocompatibles con los mecanismos de defensa del organismo. Los resultados experimentales también evidenciaron que el número de queratinocitos humanos es siempre superior a 19.000 células/0,1 ml, independientemente de las concentraciones v/v de la solución de decocción utilizadas (Figura 2b).

5 *EVALUACIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIPSORIÁSICA*

El estudio se llevó a cabo utilizando la decocción de DL en 30 pacientes a los que se les explicó el protocolo del estudio y que dieron su consentimiento informado (ahora registrado en el consultorio médico donde se llevó a cabo el estudio). Se trataron cuatro pacientes con una mezcla de hojas de DL secas y cortadas, mezcladas con glicerina (mezcla glicérica).

10 *Tratamiento con decocción de DL*

Se tomaron fotografías antes del tratamiento (con el consentimiento de los sujetos) como registro de la patología inicial y para evaluar la eficacia del tratamiento propuesto (Figura 5).

Se pidió a los pacientes que continuaran con el tratamiento dos veces al día frotando la decocción con una gasa de algodón.

15 Después de la remisión de las placas, el tratamiento se administró una vez al día durante 1 mes. Todos los pacientes tratados con la decocción mostraron una remisión total de las placas psoriásicas ya después de 20 días de tratamiento, como se muestra en las imágenes adjuntas (Figura 6).

Tratamiento con hojas de DL secas

Se repitió el mismo estudio que el anterior utilizando la mezcla glicérica dos veces al día.

20 A diferencia de los sujetos tratados con la decocción, los sujetos tratados con las hojas secas no mostraron, incluso después de un mes de tratamiento, ninguna mejora significativa (Figura 7).

PREPARACIÓN DE FORMULACIONES TÉCNICAS QUE CONTIENEN LA DECOCCIÓN DE DL

La decocción de DL descrita en la presente invención está destinada a su uso tópico y es el punto de partida para distintos productos a aplicar en la piel (geles acuosos, emulsiones, productos detergentes, lociones).

25 Por ejemplo, se prepararon las siguientes formulaciones (todos los productos utilizados están disponibles en el mercado y son conocidos en el campo de las preparaciones cosméticas y cosmeceúticas):

GEL 1	
Extracto de DL en agua	0,5-5 %
Hidroxipropilcelulosa	2,5 %
Conservante	0,2 %
Agua	c.s. hasta 100

El extracto se añade al agua conservada, se calienta a 50 °C y a continuación se añade la hidroxipropilcelulosa. La solución se agita vigorosamente.

GEL 2	
Extracto de DL en agua	0,5-5 %
Carbómero	1,5 %
Conservante	0,2 %
Trietanolamina	c.s. hasta pH 4.5
Agua	c.s. hasta 100

El extracto se añade al agua conservada, la solución se agita ajustando el pH con trietanolamina.

30 *EMULSIÓN DE A/A*

<i>Fase oleosa</i>	
Triglicérido caprílico/cáprico	7,5 %
PEG 15 estearil éter	7,5 %
Isohexadecano	15 %
Aceites de silicona	5 %
PEG-10 succinato de isohexacontano de gliceriloleato	4 %
<i>Fase acuosa</i>	
Extracto de DL en agua	0,5-5 %
Agua destilada	c.s. hasta 100
Carbómero	2 %
Conservante	0,2 %

La emulsión de A/A se prepara añadiendo a 75 °C la fase oleosa a la fase acuosa con agitación continua y ligera. La preparación de la emulsión se lleva a cabo en un turboemulsionador abierto.

Referencias

- 5 [1] H. Fleisch, A. Reszka, G.A. Rodan, M. Rogers, Bisphosphonates-mechanism of action, en: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rodan (Eds.), Principles of Bone Biology, 2ª ed., Academic Press, San Diego, 2002, pág. 1361-1385.
- [2] M.D. Fancis, I. Fogelman, 99mTc diphosphonate uptake mechanism on bone, en: I. Fogelman (Ed.), Bone Scanning in Clinical Practice, Springer-Verlag, Nueva York, 1987, pág. 7-17.
- 10 [3] H.M. Lamb, D. Faulds. Samarium 153Sm leixidronam, Drugs Aging 1997, 11,413-418.
- [4] Solicitud de patente de EE. UU. 20090123383, Frangioni, Jhon, "Detección no isotópica de actividad osteoblástica *in vivo* utilizando bisfosfonatos modificados".
- [5] J. D. Wang, S.C. Miller, M. Sima, P. Kopeckova, J. Kopecek. Synthesis of polymeric bone-targeting drug delivery systems. Bioconjug. Chem. 2003, 14,853-859
- 15 [6] Frank S. D'Amelio Sr. Botanicals: A Phytocosmetic Desk Reference. CRC Press; 1ª edición (21 de diciembre de 1998)
- [7] Stout, G. H.; Balkenhol, W. G.; Poling, M.; Hickernell, G. L. "Isolation and structure of daphnetoxin, the poisonous principle of Daphne species". 1970 J Am Chem Soc, 92(4), 1070-1071

REIVINDICACIONES

- 5 1. Extracto de *Daphne laureola* para su uso en un procedimiento de tratamiento de dermatopatías elegidas de dermatitis crónica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, dermatitis seborreica, dermatitis inespecífica, dermatitis esporádica, caspa y psoriasis, **caracterizado porque** dicho extracto se obtiene por decocción o maceración y se administra por vía tópica.
2. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la psoriasis se elige de los siguientes tipos: psoriasis en placas, psoriasis gotosa, psoriasis pustular, psoriasis eritrodérmica, psoriasis seborreica, psoriasis amiantácea.
- 10 3. El extracto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en forma líquida, semilíquida o seca, de flores, frutos, hojas, tallos y raíces, tanto frescos como secos, de plantas de *Daphne laureola*.
- 15 4. Una composición que comprende un extracto de *Daphne laureola* y uno o más componentes farmacéutica, cosmética y cosmeceúticamente aceptables, en el que dicho extracto se obtiene por decocción o maceración para su uso en el tratamiento de dermatopatías elegidas de dermatitis crónica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, dermatitis seborreica, dermatitis inespecífica, dermatitis esporádica, caspa y psoriasis, **caracterizada porque** dicha composición se administra por vía tópica.
- 20 5. Una composición tópica que comprende un extracto de *Daphne laureola*, en la que dicho extracto se obtiene por decocción o maceración, y uno o más componentes elegidos de: emolientes, humectantes, espesantes, emulsionantes, colorantes, detergentes, desinfectantes, antioxidantes, tampones, agentes matificantes, agentes exfoliantes, aromas, aceites esenciales, vitaminas, filtros UV, colágeno, elastina y mezclas de los mismos.
- 25 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de dermatopatías elegidas de dermatitis crónica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, dermatitis seborreica, dermatitis inespecífica, dermatitis esporádica, caspa y psoriasis, **caracterizado porque** dicha composición se administra por vía tópica.
7. Las composiciones para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6 formuladas como formulaciones líquidas, tal como, por ejemplo, geles, lociones, leches, emulsiones, espumas y similares; formulaciones sólidas o semisólidas, tales como cremas, pomadas, barras y similares.
8. Las composiciones para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-7 formuladas como: champú, leche limpiadora, tónico acuoso, solución acuosa, solución alcohólica, solución hidroalcohólica, máscara, emulsión, gel a base de agua, lipogel, aceite facial y corporal, parches medicinales.
- 30 9. Las composiciones para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4, 6-8, en las que la psoriasis se elige de los siguientes tipos: psoriasis en placas, psoriasis gotosa, psoriasis pustular, psoriasis eritrodérmica, psoriasis seborreica, psoriasis amiantácea.

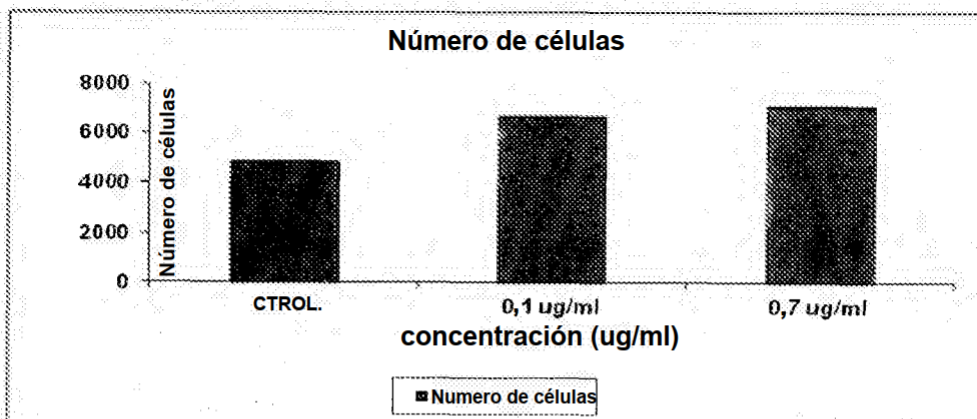


Figura 1

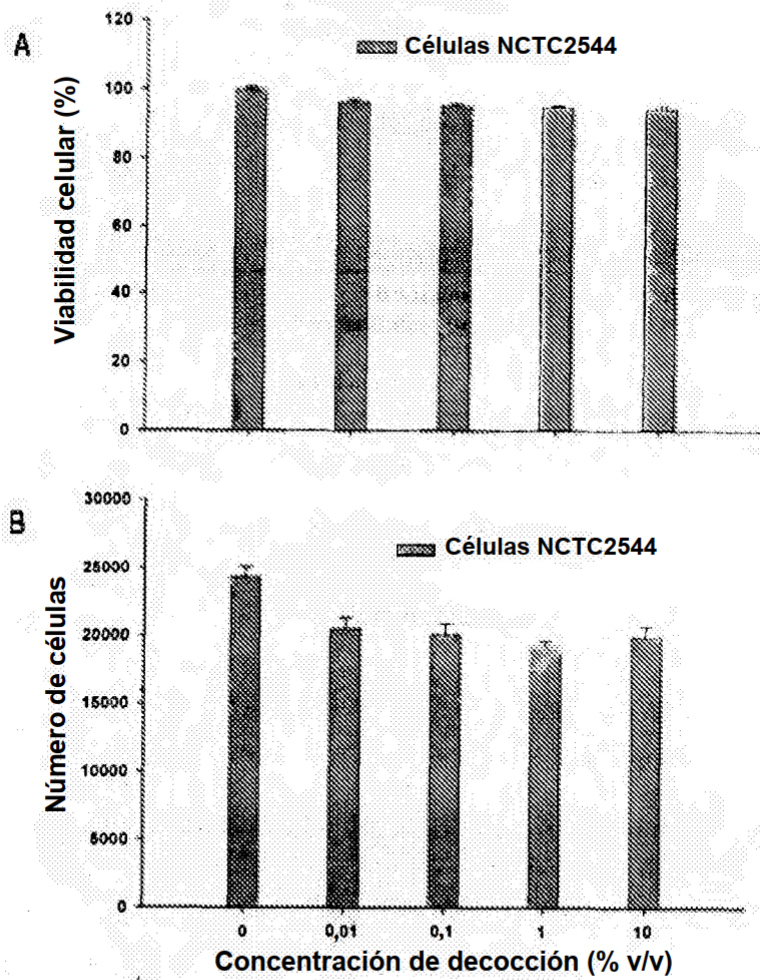


Figura 2

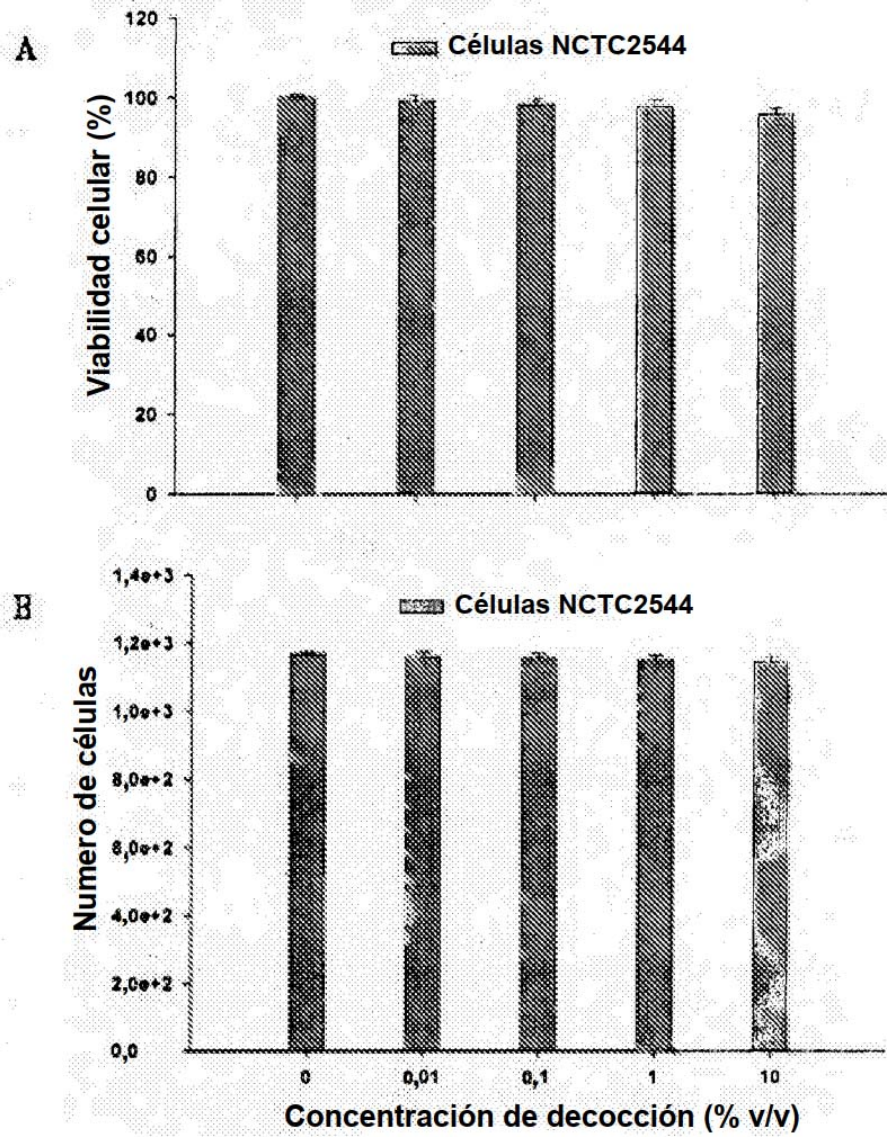


Figura 3

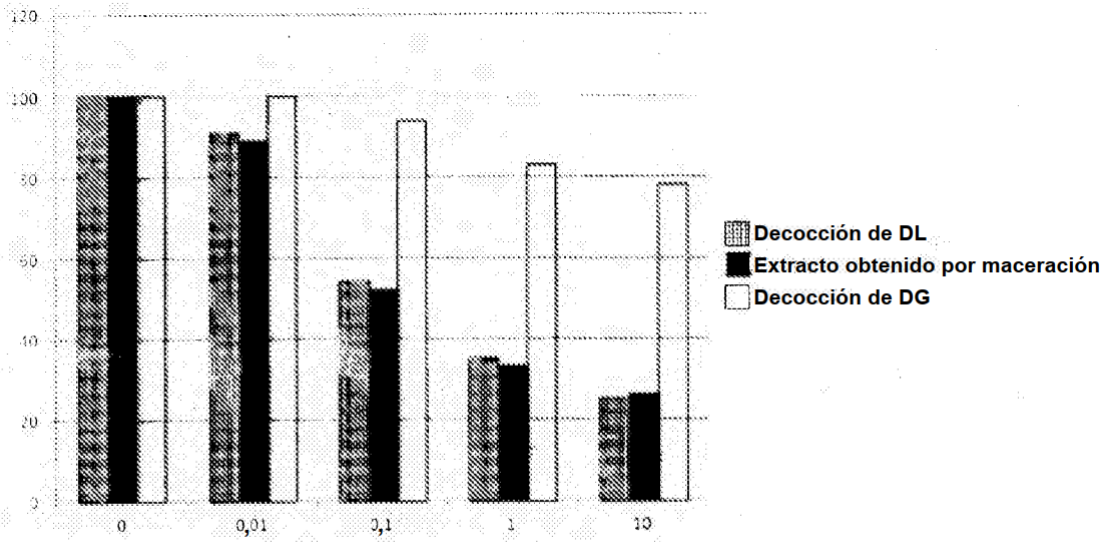


Figura 4a

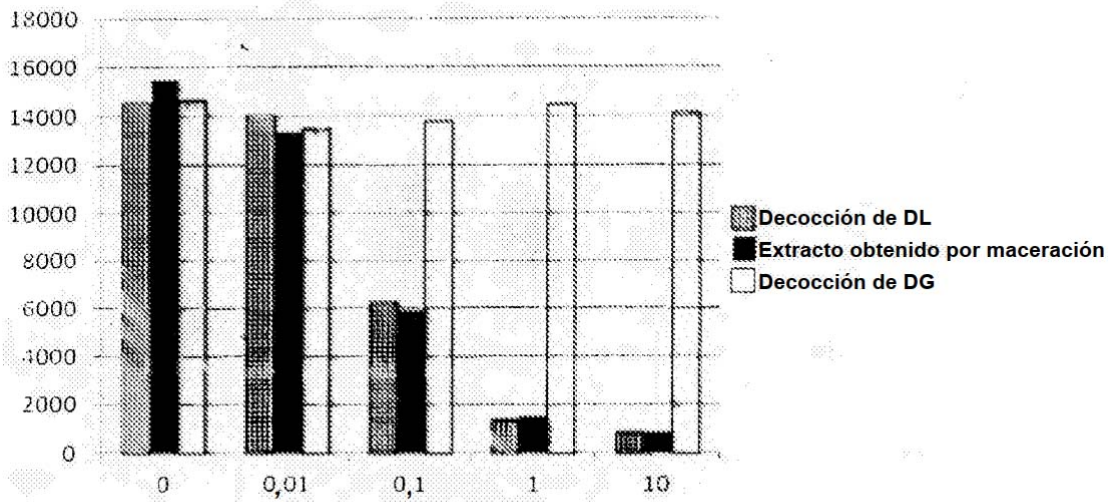


Figura 4b

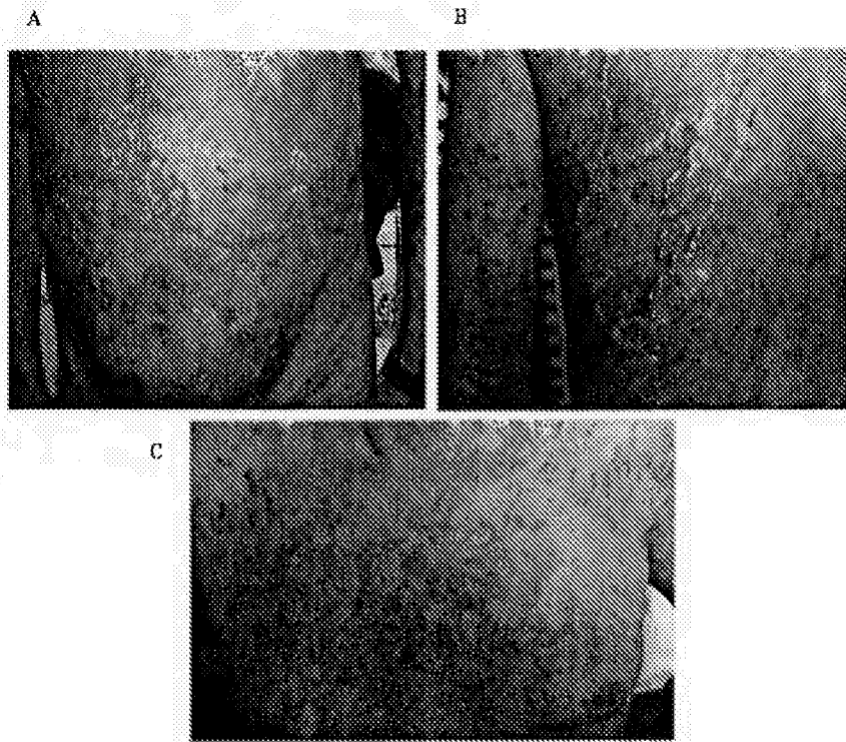


Figura 5

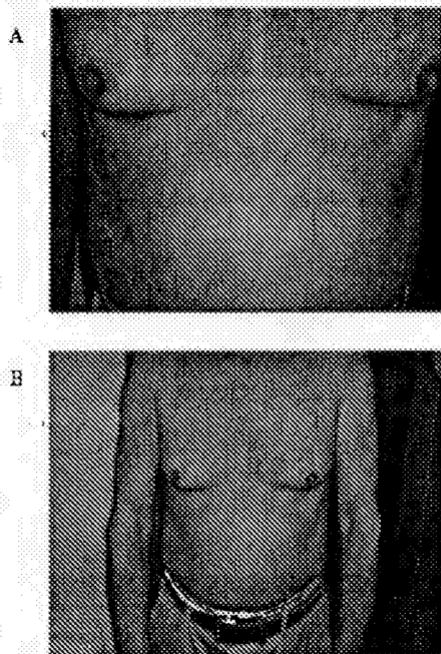


Figura 6



Figura 7

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citado en la descripción

- CN 101181427 [0015]
- GB 479688 A [0016]
- US 20090123383 A, Frangioni, Jhon [0071]

Bibliografía no de patentes citada en la descripción

- **PIERONI.** *Natural remedies and Nutraceuticals Used in Etnoveterinary Practices in Inland Southern Italy* [0016]
- *Isolation and structure of daphnetoxin, the poisonous principle of Daphne species* [0017]
- **FRANK S. D'AMELIO.** Botanicals, a Phytocosmetic Desk Reference. CRC Press, 39-48 [0028]
- Remington's Pharmaceutical Handbook. Mack Publishing Co, [0040]
- **FRANK S. D'AMELIO.** Botanicals, a Phytocosmetic Desk Reference. CRC Press, 299-305 [0040]
- Bisphosphonates-mechanism of action. **H. FLEISCH ; A. RESZKA ; G.A. RODAN ; M. ROGERS.** Principles of Bone Biology. Academic Press, 2002, 1361-1385 [0071]
- 99mTc diphosphonate uptake mechanism on bone. **M.D. FANCIS ; I. FOGELMAN.** Bone Scanning in Clinical Practice. Springer-Verlag, 1987, 7-17 [0071]
- **H.M. LAMB; D. FAULDS.** Samarium 153Sm lexidronam. *Drugs Aging*, 1997, vol. 11, 413-418 [0071]
- **J. D. WANG ; S.C. MILLER ; M. SIMA ; P. KOPECKOVA ; J. KOPECEK.** Synthesis of polymeric bone-targeting drug delivery systems. *Bioconjug. Chem.*, 2003, vol. 14, 853-859 [0071]
- **FRANK S. D'AMELIO SR.** Botanicals: A Phytocosmetic Desk Reference. CRC Press, 21 December 1998 [0071]
- **STOUT, G. H. ; BALKENHOL, W. G. ; POLING, M. ; HICKERNELL, G. L.** Isolation and structure of daphnetoxin, the poisonous principle of Daphne species. *J Am Chem Soc*, 1970, vol. 92 (4), 1070-1071 [0071]