

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 016 559**

51 Int. Cl.:

A61K 31/37 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/70 (2006.01)

A61K 47/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2019 PCT/IB2019/060337**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2020 WO20110089**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2019 E 19836819 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2025 EP 3886808**

54 Título: **Urolitina A y composición que contiene la misma para uso externo en inflamaciones de diversas etiologías**

30 Prioridad:

29.11.2018 PL 42794418

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

09.05.2025

73 Titular/es:

**MICROBIOTA MED SP. Z O.O. (100.00%)
ul. Grójecka 43/1A
02-031 Warszawa, PL**

72 Inventor/es:

**PIWOWARSKI, JAKUB;
GRANICA, SEBASTIAN;
SACHARCZUK, MARIUSZ y
NARUSZEWICZ, MAREK**

74 Agente/Representante:

VÁZQUEZ FERNÁNDEZ-VILLA, Concepción

ES 3 016 559 T3

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

DESCRIPCIÓN

Urolitina A y composición que contiene la misma para uso externo en inflamaciones de diversas etiologías

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una o más sustancias auxiliares típicas y un principio activo, en donde como principio activo la composición contiene urolitina A, 3,8-diacetato de urolitina A, preferiblemente urolitina A sintética, para su uso en el tratamiento, la inhibición y la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel y/o de las membranas mucosas, y en donde la composición es para administración externa tópica.

La composición administrada por vía tópica en inflamaciones de diversas etiologías actúa reduciendo el nivel de S100A8/A9 (calprotectina) y estimulando la fosforilación de las cinasas MAP ERK1/2.

15 **Antecedentes de la invención**

Las inflamaciones de la piel de diversas etiologías afectan a una gran parte de la sociedad. La dermatitis atópica (DA) se produce en aproximadamente el 20 % de los niños y el 7 % de los adultos. Se observa un aumento particular de la incidencia de la dermatitis atópica en los países desarrollados (Odhiambo *et al.*, 2009). La patogenia de la DA es muy compleja. Implica células del sistema de respuesta inflamatoria específica (linfocitos T, mastocitos) así como células del sistema de respuesta inflamatoria no específica (neutrófilos, macrófagos). Actualmente se cree que los linfocitos Th2 que producen IL-4, IL-5 e IL-13, cuya secreción está asociada con un aumento de la producción de inmunoglobulina E, desempeñan un papel importante en el curso de la DA (Eichenfield *et al.*, 2016).

La psoriasis es una enfermedad que afecta al 2-5 % de la población mundial. Está asociada a una hiperproliferación e hiperqueratosis de las células epidérmicas. Como consecuencia, se producen un engrosamiento epidérmico y una infiltración inflamatoria de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células T en la dermis. Las principales rutas de señalización responsables del desarrollo de lesiones psoriásicas en la piel son: la ruta de la proteína S100 (incluyendo S100A8/A9), la ruta de Wnt, la ruta de JAK-STAT, y la ruta de RAR (Yadav *et al.*, 2018).

La etiología de las inflamaciones de la piel es muy compleja y depende de la interacción entre las células de la piel, queratinocitos y fibroblastos, y las células inmunitarias, mastocitos, linfocitos, monocitos, macrófagos, neutrófilos, y células dendríticas. En los últimos años, a la proteína dimérica calprotectina se le ha empezado a atribuir un papel especial en las inflamaciones de la piel de diversas etiologías, incluyendo la dermatitis atópica y la psoriasis (D'Amico *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2014; Schonhaler *et al.*, 2013). La proteína heterodimérica S100A8/A9 (calprotectina, calgranulina) se considera actualmente uno de los factores clave que regulan la respuesta inflamatoria. Pertenece a la familia de proteínas de unión a Ca^{2+} y se encuentra en grandes cantidades en el citoplasma de los neutrófilos (hasta el 40 % de las proteínas citosólicas solubles) y el citoplasma de los monocitos (hasta el 5 %). Al secretarse pasiva o activamente por los neutrófilos y macrófagos, realiza sus funciones efectoras uniéndose a los glicosaminoglicanos y a los receptores de reconocimiento de patrones: receptor 4 tipo Toll 4 (TLR4) y receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) en la superficie de las células endoteliales, fagocitos y linfocitos. Se ha demostrado que S100A8/A9 aumenta la secreción de IL-8, IL-6, MCP-1 y moléculas de adhesión por las células endoteliales y contribuye al aumento de la permeabilidad de la monocapa mediante la desorganización de la F-actina e la inhibición de la expresión de E-cadherina, zonula occludens-1 (ZO-1) y β -catenina. Al interactuar con el receptor TLR4 en la superficie de los neutrófilos, S100A8/A9 provoca una disminución en la expresión superficial de L-selectina (CD62L) y un aumento en el nivel de integrina $\beta 2$ (CD11b/CD18) que condiciona la adhesión estrecha y la diapédesis. Se ha demostrado que estos efectos pueden estar asociados con la activación de las cinasas MAPK/ERK y la ruta de NF- κ B. Además, también se ha demostrado que S100A8/A9 aumenta significativamente la producción de IL-17 por las células T CD8+. Se cree que la proteína S100A8/A9 por sí sola no tiene propiedades quimiotácticas, pero induce la quimiotaxis activando las células inmunitarias. El nivel de S100A8/A9 se correlaciona estrechamente con la progresión de la inflamación y, por tanto, a menudo se considera un biomarcador importante en diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias (reumatismo, enfermedad inflamatoria intestinal, inflamación de la piel, vasculitis, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, esclerodermia, esclerosis múltiple, arteritis de células gigantes, psoriasis, fibrosis quística, rechazo de aloinjerto renal, infecciones, enfermedades cardiovasculares). Actualmente, S100A8/A9 se considera un factor clave que estimula la respuesta inflamatoria, cuya regulación puede suprimir las funciones de las células inmunitarias responsables de la progresión de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias (Pruenster *et al.*, 2016).

Resultados de investigaciones publicadas recientemente indican que S100A8/A9 puede ser una diana interesante en el desarrollo de nuevas terapias para enfermedades inflamatorias. Hasta la fecha, sólo compuestos del grupo de derivados de quinolina-3-carboxamida han demostrado inhibir la interacción de S100A8/A9 con el receptor TLR4 (Bjork *et al.*, 2009). También es importante que en estudios clínicos dichos compuestos hayan mostrado actividad contra la esclerosis múltiple (Comi *et al.*, 2012), el lupus eritematoso (Bengtsson *et al.*, 2012) y la enfermedad de Crohn (D'Haens *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que, en las inflamaciones de la piel, la disminución de la actividad de la cinasa ERK1/2 es de gran importancia, ya que conduce a la estabilización del ARNm de las citocinas proinflamatorias y, por consiguiente, a un aumento de la producción de las mismas y a la progresión de la inflamación. Por tanto, la estimulación de la ruta de fosforilación de ERK1/2 puede ser una diana importante a la hora de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para las inflamaciones de la piel de diversas etiologías (Pastore *et al.* 2005).

En los últimos años, el conocimiento sobre el papel de la microbiota intestinal en el mantenimiento de la homeostasis en el cuerpo humano ha comenzado a desarrollarse de manera dinámica. La actividad de la microbiota intestinal se considera de importancia clave para la salud, principalmente a través del efecto de los nutrientes y xenobióticos en el sistema inmunológico y el metabolismo (Tuohy y Del Rio, 2015). Los resultados de la investigación, que se refieren a cambios en la estructura de los compuestos ingeridos por vía oral que se ve influenciada por la microbiota intestinal, hacen que ahora sea necesario tener en cuenta la actividad biológica de los metabolitos formados en el intestino al evaluar el impacto de las sustancias presentes en los alimentos y los medicamentos en el cuerpo humano (Haiser y Turnbaugh, 2013).

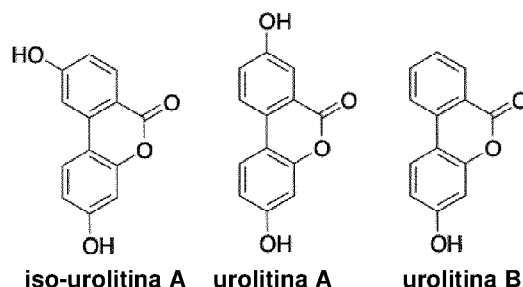
Uno de los grupos de compuestos sujetos a cambios estructurales significativos bajo la influencia de la microbiota intestinal son los elagitaninos, que son polifenoles de alto peso molecular, que se encuentran en productos alimenticios tales como nueces, avellanas, almendras, zumo de granada, frambuesas, fresas y vino añejado en barricas de roble y en muchas plantas medicinales. La biodisponibilidad de estos compuestos en estado inalterado, debido a la estructura de alto peso molecular y la naturaleza hidrófila y la susceptibilidad a la hidrólisis, no está completamente establecida o incluso se considera dudosa. Sin embargo, se sabe que los elagitaninos se metabolizan bajo la influencia de la microbiota intestinal a derivados de dibenzo[b,d]piran-6-ona, a saber, urolitinas, que a diferencia de los elagitaninos, son compuestos lipófilos de bajo peso molecular con una biodisponibilidad bien documentada, que puede alcanzar concentraciones micromolares en sangre, tejidos, heces y orina (Espin *et al.*, 2013). Se encontraron en estudios *in vivo* efectos beneficiosos de alimentos ricos en elagitanino administrados por vía oral sobre enfermedades inflamatorias crónicas. Se destacan particularmente efectos positivos de alimentos ricos en elagitanino sobre el sistema cardiovascular y la enfermedad inflamatoria intestinal. Debido al metabolismo de los elagitaninos por la microbiota intestinal, tal como se ha demostrado en los últimos años, se cree que las urolitinas formadas en el intestino pueden ser las responsables de los efectos observados (Colombo *et al.*, 2013; Larrosa *et al.*, 2010a; Piwowarski *et al.*, 2014b; Tomas-Barberan *et al.*, 2016).

Las inflamaciones de la piel de diversas etiologías afectan a una gran parte de la sociedad. La dermatitis atópica se presenta en el 20 % de los niños y el 7 % de los adultos y es común tanto en países desarrollados como en desarrollo. Los esteroides tópicos, incluyendo la hidrocortisona, son los medicamentos de primera línea para la DA y la psoriasis. Las indicaciones para el uso tópico de hidrocortisona y otros fármacos esteroides son enfermedades de la piel tales como lupus eritematoso, eritema multiforme, dermatitis seborreica; picaduras de insectos (para reducir el dolor, el picor y las molestias de hinchazón después de las picaduras, especialmente si el sujeto es alérgico al veneno de los insectos que pican); acné (eczemas); cambios en la piel provocados por la toma de medicamentos; quemaduras de primer y segundo grado; picor en la piel; enrojecimiento de la piel. Sin embargo, el uso de fármacos esteroides está asociado con efectos secundarios graves tales como infecciones bacterianas y fúngicas, atrofia cutánea, cambios en la pigmentación de la piel, telangiectasias, y el riesgo de actuar sobre el eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal (especialmente en niños). Además, la eficacia de los fármacos esteroides está limitada por la aparición de taquifilaxia (debilitamiento del efecto provocado por el uso prolongado del fármaco), lo que limita la eficacia en el tratamiento de las inflamaciones crónicas de la piel. Cuando la terapia con esteroides es ineficaz o no puede usarse debido a la hipersensibilidad existente, se introduce la terapia con inhibidores de calcineurina (tacrolimus, pimecrolimus). Sólo puede llevarse a cabo durante un corto periodo de tiempo y está asociado con un mayor riesgo de cáncer (cáncer de piel no melanoma y linfoma) y con un mayor riesgo de infecciones virales, por ejemplo, *Herpes simplex*. En el caso del tratamiento tópico de la DA con fármacos esteroides e inhibidores de calcineurina, la enfermedad en la mayoría de los casos reaparece después de seis meses como máximo (Berth-Jones *et al.*, 2003; Breneman *et al.*, 2008; Papier y Strowd, 2018).

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una o más sustancias auxiliares típicas y un principio activo, que como principio activo contiene urolitina A, 3,8-diacetato de urolitina A, preferiblemente urolitina A sintética, para su uso en el tratamiento, la inhibición y la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel y/o de las membranas mucosas, en donde la composición es para administración externa tópica.

La urolitina A pertenece a los derivados de dibenzo[b,d]piran-6-ona. Es un metabolito producido por la microbiota intestinal a partir de taninos pertenecientes al grupo de elagitaninos que se encuentran en algunos productos alimenticios, es decir, frutos de granada, fresas, frambuesas, nueces o en la maduración del vino en barricas de roble. A diferencia de los elagitaninos de los que se forma, la urolitina A es un compuesto lipófilo de molécula pequeña con una biodisponibilidad bien documentada. Tras su absorción en el intestino, la urolitina A se conjuga con ácido glucurónico y, por tanto, está presente en forma de glucurónidos tanto en los tejidos como en el torrente sanguíneo. Se sabe que no todas las personas producen todos y cada uno de los tipos de urolitina. Los estudios publicados hasta ahora muestran que hay personas que producen como compuesto dominante urolitina A, iso-urolitina A o urolitina B o que no producen urolitina en absoluto (Piwowarski *et al.*, 2016; Tomas-Barberan *et al.*,

2017). La urolitina A se distingue de la iso-urolitina A por la orientación de los grupos hidroxilo, mientras que su número distingue a la urolitina B de la urolitina C. Con una molécula tan pequeña, un ligero cambio en la disposición y cantidad de grupos hidroxilo es crucial para la actividad del compuesto. Los estudios realizados hasta ahora indican que tanto el número como la orientación de los grupos hidroxilo determinan cambios en la actividad biológica de compuestos individuales (Piwowarski *et al.*, 2014a; Piwowarski *et al.*, 2015).



10 La urolitina A es un metabolito formado en el intestino grueso a partir de compuestos presentes en los alimentos bajo la influencia de la microbiota intestinal. Su concentración en heces, tejidos, sangre y orina tras la ingestión de productos alimenticios ricos en elagitaninos puede alcanzar los 100 μ M. Basándose en ello, puede concluirse que el uso externo de este compuesto conlleva muy poco riesgo de efectos tóxicos o efectos secundarios graves, incluyendo también la exposición crónica del organismo a esta sustancia. El problema que surge con el uso de urolitina A endógena es el hecho de que no todos los seres humanos tienen bacterias que pueden producir urolitina A. Además, los organismos responsables de este proceso aún no se han identificado, lo que impide la manipulación de la composición de la microbiota intestinal para inducir la producción de urolitina A en el intestino grueso. Por otra parte, la administración oral directa de urolitina A no permite alcanzar concentraciones terapéuticas de este compuesto, ya que durante su transporte a través del tracto gastrointestinal sufre una deshidroxilación adicional que conduce a la formación de urolitina B. A su vez, la urolitina A, o bien administrada por vía oral o bien producida endógenamente, sufre un metabolismo intensivo durante su paso por la pared intestinal. El metabolismo de fase II consiste en el acoplamiento de algunos xenobióticos con metabolitos reactivos en el cuerpo, haciéndolos más solubles en el entorno acuoso de los líquidos corporales y, como consecuencia, más fácilmente excretados en la orina. Las reacciones de acoplamiento que se producen en la fase II de la biotransformación son catalizadas principalmente por enzimas de la clase de las transferasas, y los metabolitos que participan en estas reacciones son los aminoácidos, el glutatión, y los ácidos activados, es decir, ácidos acético, sulfúrico y, especialmente, glucurónico. Como consecuencia de este proceso, no es la urolitina A libre, sino sus formas conjugadas con ácido glucurónico, las que están presentes en el torrente sanguíneo y los tejidos. Tal como se muestra en estudios *in vitro* anteriores, tanto la deshidroxilación como la glucuronidación de la urolitina A pueden conducir a un cambio o pérdida de actividad (Tomas-Barberan *et al.*, 2017; Tomas-Barberan *et al.*, 2018).

Las restricciones anteriores asociadas con el metabolismo de los elagitaninos y la urolitina A relacionadas con su uso oral han llevado a intentar usar las propiedades antiinflamatorias de la urolitina A en una composición tópica aplicada a la piel. La aplicación del compuesto directamente a la piel evita el problema de la desactivación bajo la influencia de las enzimas de fase II y da como resultado la obtención de concentraciones activas del compuesto directamente en el lugar de la inflamación, que no puede lograrse con el consumo normal de alimentos que contienen elagitaninos o con la administración oral de urolitina A.

Además, los estudios publicados en julio de 2017 no indican toxicidad de la urolitina A en un modelo animal tanto por administración oral como intravenosa (Heilman *et al.* 2017 Food and Chemical Toxicology doi: 10.1016 / j.fct.2017.07.050). Además, la urolitina A es un compuesto con un mecanismo de acción completamente diferente en comparación con los fármacos esteroides y los inhibidores de calcineurina usados en la terapia hasta ahora, es decir, inhibe la liberación de calprotectina e inhibe la translocación de la subunidad NF- κ B al núcleo (Piwowarski *et al.*, 2015).

Un aspecto ventajoso es también el hecho de que la urolitina A es una alternativa eficaz a los fármacos esteroides y a los inhibidores de calcineurina usados actualmente que muestran una baja eficacia en muchos casos de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias de la piel/de las membranas mucosas. El uso de fármacos esteroides está asociado a la aparición de efectos de taquifilaxia, es decir, disminución de la eficacia del fármaco provocada por su uso frecuente, lo que limita su eficacia en el tratamiento de inflamaciones crónicas. Este efecto es característico de fármacos cuya acción se basa en el mecanismo mediado por receptores. La urolitina A es una sustancia que inhibe la secreción de calprotectina e inhibe la ruta de señalización asociada al proceso de translocación de la subunidad p65 de NF- κ B al núcleo y no ha demostrado hasta el momento tener actividad receptora, por lo que el efecto de taquifilaxia de la urolitina A no debería limitar su eficacia en el uso crónico.

En vista del hecho de que la urolitina A es un compuesto producido en el intestino a partir de los elagitaninos presentes en productos alimenticios típicos, existe un bajo riesgo de efectos tóxicos o efectos adversos graves *in*

vivo también con la exposición crónica a esta sustancia.

También debe enfatizarse que la reducción del riesgo de efectos secundarios por el uso externo de urolitina A afecta significativamente a los resultados de la terapia, lo que no genera costes adicionales asociados con el tratamiento posterior. En el 16-43 % de los pacientes que usan esteroides tópicos, se observan infecciones bacterianas y fúngicas en las áreas tratadas, que deben tratarse farmacológicamente. También se han descrito atrofia de la piel, cambios en la pigmentación (hipo e hiperpigmentación) e hipersensibilidad de contacto a los esteroides, que imposibilitan la terapia posterior. La terapia con inhibidores de calcineurina sólo puede llevarse a cabo durante un corto periodo de tiempo y está asociada con un mayor riesgo de cánceres de piel.

Por eso es tan importante intentar identificar un compuesto y preparar una composición que contenga el compuesto que sería eficaz en el tratamiento de casos resistentes a la terapia convencional y su uso no estaría asociado con el riesgo de efectos adversos graves.

El uso oral o parenteral de urolitina A y sus efectos terapéuticos sistémicos se conocen en la técnica.

La publicación *Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism* (Larrosa *et al.*, 2010b) se refiere al efecto de la administración oral de extracto de granada en una dosis de 250 mg/kg o de urolitina A en una dosis de 15 mg/kg sobre la inflamación intestinal provocada por el sulfato de dextrano sódico en ratas. El extracto y la urolitina A se administraron durante 25 días, y la inflamación intestinal se indujo mediante la administración de DSS durante los últimos 5 días del experimento. Basándose en los resultados obtenidos, los autores concluyeron que, en el caso del colon inflamado, la actividad terapéutica se muestra principalmente por el extracto de granada y sus elagitaninos, mientras que la actividad antiinflamatoria de la urolitina A solo puede ser relevante en individuos sanos. Los autores del estudio llegaron a tales conclusiones mediante la investigación de muestras fecales de animales que recibieron urolitina A, en las que se encontraron pequeñas cantidades de este compuesto. Probablemente sufrió un metabolismo adicional bajo la influencia de la microbiota intestinal o fue absorbido y sufrió un metabolismo de fase II.

La publicación *In vivo anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A* (Ishimoto *et al.*, 2011) se refiere al efecto de la administración oral de urolitina A sobre el edema de la pata inducido por carragenina en ratones. La administración oral de urolitina A una hora después de la inducción del edema redujo significativamente su tamaño durante las siguientes 24 horas del experimento. Según los autores, el modelo usado permite evaluar el potencial antiinflamatorio sólo para fármacos administrados por vía oral. Al mismo tiempo, se encontró en el plasma la presencia de metabolitos de fase II de la urolitina A, es decir glucurónidos. Por tanto, puede concluirse que la urolitina A administrada por vía oral se metaboliza y, por tanto, su producto metabólico, el glucurónido de urolitina A, es responsable de los cambios observados.

El documento de patente EP2068864B1 da a conocer el uso terapéutico de urolitina seleccionada del grupo que consiste en: urolitina B, urolitina A, hidroxí-urolitina A, metil-urolitina A, para el tratamiento y/o la prevención del cáncer en un sujeto. Se sabe que los metabolitos de elagitaninos tienen actividad antiproliferativa y/o proapoptótica y como tal encuentran uso en el tratamiento y la prevención de muchos cánceres. Sin embargo, en contraste con lo anterior, la presente solicitud da a conocer el uso de urolitina A para inflamaciones de la piel. Las inflamaciones de la piel de diversas etiologías están relacionadas con una respuesta inflamatoria aumentada de las células inmunitarias, pero no son cancerosas. La inhibición de la inflamación de la piel *in vivo* mediante administración tópica de una composición de urolitina A, tal como han demostrado los inventores, está asociada a una inhibición local de los procesos inflamatorios y no está relacionada con un efecto inhibitor sobre la proliferación celular o la inducción de la apoptosis en los mismos. Además, en estudios previos realizados en neutrófilos y macrófagos no se observó actividad citotóxica ni antiproliferativa de la urolitina A (Piwowarski *et al.*, 2014a; Piwowarski *et al.*, 2014b; Piwowarski *et al.*, 2015).

La solicitud estadounidense US2010323985A da a conocer el uso de un compuesto del grupo de las urolitinas, la urolitina B, como componente de una preparación farmacéutica o cosmética para uso tópico y/o parenteral. Sin embargo, el documento en cuestión no se refiere al uso de la urolitina B como tal, sino a la combinación de ácido hialurónico y al menos un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, en particular para su uso dermatológico en seres humanos, y en particular en el tratamiento mediante relleno de arrugas, líneas finas, defectos de fibroblastos y cualquier cicatriz o en cirugía reconstructiva. La urolitina B se ha indicado como ejemplo de uno de los inhibidores de la degradación del ácido hialurónico, solo o en mezcla. Con respecto a lo anterior, los inventores realizaron experimentos según el método de la farmacopea (USP), observando como resultado que no hay efecto de la urolitina A sobre la actividad hialuronidasa. Sin embargo, se observó actividad inhibitora con respecto a dicha enzima para los elagitaninos, entre los que la urolitina A es producida por la microbiota intestinal (Piwowarski y Kiss, 2015). Además, el uso de un compuesto perteneciente a la familia de las urolitinas dado a conocer en la solicitud anterior no se refiere a la dermatitis atópica, ya que no existen datos en la bibliografía que confirmen una mayor degradación del ácido hialurónico en esta afección. Además, en el caso de la psoriasis, actualmente están realizándose investigaciones sobre la eficacia de las inyecciones subcutáneas de hialuronidasa (preparación Hylenex; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01987609>).

La solicitud de patente japonesa JP2017007951A se refiere a un nuevo uso de urolitinas para inhibir el fotoenvejecimiento provocado por la influencia de la radiación UV sobre la piel. La descripción de la solicitud da a conocer una fórmula general para urolitinas, que indica un efecto conjunto de urolitinas, por ejemplo, urolitina A, urolitina B, urolitina C, urolitina D, urolitina E, urolitina M3, urolitina M4, en la inhibición del fotoenvejecimiento. Las propiedades de la urolitina A descritas por los inventores en la solicitud se refieren a la protección directa de la piel contra la radiación UV, que está asociada únicamente a las propiedades fisicoquímicas y no farmacológicas de la molécula. La exposición a la radiación UV como factor dañino para los tejidos acelera el envejecimiento de la piel y la exposición excesiva a la radiación en una sola ocasión puede provocar inflamación de la piel (quemaduras solares) y cánceres (D'Orazio *et al.*, 2013). La urolitina A se usa en el presente documento como compuesto que absorbe la radiación UV y, por tanto, previene la acción dañina de la piel, cuya consecuencia indirecta tras la exposición aguda es la inflamación de la piel provocada, por ejemplo, por quemaduras solares. La solicitud se refiere en particular a la prevención de la dermatitis provocada por una exposición excesiva a la radiación UV, y no se refiere a otras afecciones inflamatorias. En la bibliografía no existen informes conocidos sobre la inducción de dermatitis atópica o psoriasis por radiación UV. Además, se conoce el uso generalizado de la radiación UV en fototerapia para la dermatitis atópica y la psoriasis.

La solicitud de patente internacional (WO2014004902A2) se refiere al uso de compuestos del grupo de las urolitinas y sus precursores como sustancias que estimulan la autofagia y, por tanto, inhiben los procesos de envejecimiento. La solicitud se basa en los resultados de pruebas *in vitro* e *in vivo* que indican las urolitinas como compuestos que promueven la autofagia y así previenen los procesos de envejecimiento, aumentan la fuerza de los músculos de los animales y su actividad locomotora. Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo únicamente para la urolitina A administrada por vía oral y no incluyeron pruebas del metabolismo de la urolitina A en el tracto gastrointestinal de animales y bajo la influencia de enzimas de fase II. Debido al efecto estimulante de la autofagia reconocido tras la administración oral, los presentes inventores suponen que los compuestos que pertenecen al grupo de las urolitinas pueden usarse en el tratamiento de afecciones en las que la estimulación de este proceso es deseable. Entre muchas afecciones, también se mencionan enfermedades de la piel: envejecimiento de la piel, fotoenvejecimiento, inflamación de la piel y psoriasis, como aquellas en las que la estimulación del proceso de autofagia puede resultar beneficiosa. Sin embargo, no se han realizado estudios que indiquen actividad antiinflamatoria de la urolitina A tras la aplicación tópica en la piel, y no se incluyeron en los estudios procesos que son clave para el desarrollo de inflamaciones de la piel de diversas etiologías, incluyendo la dermatitis atópica y la psoriasis.

A diferencia de la solicitud internacional descrita anteriormente, la esencia de la presente invención es la acción antiinflamatoria directa sobre la piel, tal como se describe en el modelo *in vivo*, asociada con la aceleración del proceso de curación, reducción de la frecuencia de rascado y reducción de la población de células inmunitarias responsables de la progresión de la inflamación (leucocitos, monocitos y neutrófilos) que pueden estar conectados con la inhibición de la liberación de calprotectina. Los procesos anteriores no están relacionados con el efecto estimulante de la autofagia descrito anteriormente de la urolitina A tras la administración oral. Además, según la bibliografía disponible, la inhibición del proceso de autofagia no es crucial para la progresión de las inflamaciones de la piel de diversas etiologías, incluyendo la psoriasis, ni se conoce el papel del proceso de autofagia en la etiología de la dermatitis atópica (Deng *et al.*, 2016; Furue *et al.*, 2018; Weidinger y Novak, 2016; Yadav *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos y descritos en la solicitud de patente anterior también se mencionan en la solicitud de patente internacional (WO2015097231A1), que da a conocer el uso de compuestos del grupo de derivados de aminoácidos de urolitinas como sustancias que tienen una mayor solubilidad que las urolitinas y que liberan urolitinas en el tracto gastrointestinal tras la administración oral. Los resultados presentados en la solicitud se relacionaron con propiedades que promueven la autofagia y, por tanto, inhiben los procesos de envejecimiento, lo que se describe para las urolitinas orales. Sin embargo, a diferencia de lo anterior, la presente solicitud se refiere a efectos antiinflamatorios directos sobre la piel asociados con la aceleración del proceso de curación, la reducción de la frecuencia de rascado y la reducción de la respuesta de las células inmunitarias responsables de la progresión de la inflamación. Estos procesos no están relacionados en absoluto con los efectos estimulantes de la autofagia descritos anteriormente de la urolitina A tras la administración oral. Además, según la bibliografía disponible, la inhibición del proceso de autofagia no es crucial para la progresión de las inflamaciones de la piel de diversas etiologías, incluyendo la psoriasis, y también se desconoce el papel del proceso de autofagia en la etiología de la dermatitis atópica (Deng *et al.*, 2016; Furue *et al.*, 2018; Weidinger y Novak, 2016; Yadav *et al.*, 2018).

A su vez, la solicitud de patente internacional WO2018162645A1 se refiere al uso tópico de preparaciones que contienen urolitinas para reducir la hiperpigmentación de la piel y sólo describe el posible uso cosmético para tratar la hiperpigmentación. Los estudios se realizaron en condiciones *in vitro* en las que la urolitina A provoca una reducción de la producción de melanina en las células de la piel. Las composiciones dadas a conocer en el presente documento están destinadas al tratamiento de afecciones de la piel mediante su administración tópica, preferiblemente al tratamiento de la hiperpigmentación, pero también se incluyen enfermedades inflamatorias de la piel tales como la dermatitis y la psoriasis. Sin embargo, este documento no proporciona evidencias ni datos experimentales para el uso tópico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel y la psoriasis.

De manera similar, en un artículo científico "Antimelanogenic Effect of Urolithin A and Urolithin B, the Colonic Metabolites of Ellagic Acid, in B16 Melanoma Cells" (Shang-Ta Wang *et al.*, 2017) se ha descrito que la urolitina A

(UA) y B (UB), principales metabolitos de los derivados del ácido elálgico dietético producidos por la microbiota intestinal, muestran eficacia en la despigmentación al suprimir la actividad de la tirosinasa.

Sin embargo, la hiperpigmentación de la piel no depende únicamente de la etiología de las enfermedades inflamatorias de la piel y de las membranas mucosas, y su inhibición no es el objetivo de la presente invención, sino que difiere según el contexto de la enfermedad. A diferencia de la hiperpigmentación que resulta de trastornos de la síntesis y distribución del pigmento natural de melanina en la piel, la causa inmediata de la dermatitis atópica y la psoriasis es una respuesta aumentada del sistema inmunitario. La presente solicitud da a conocer el efecto antiinflamatorio de la urolitina A sobre la piel que puede usarse para tratar la dermatitis atópica y la psoriasis que no resultan de la hiperpigmentación de la piel (Deng *et al.*, 2016; Furue *et al.*, 2018; Weidinger y Novak, 2016; Yadav *et al.*, 2018).

Por tanto, a la luz de lo anterior, un experto en la técnica no estaría motivado y no podría, sin un aporte creativo, llegar a la solución de la presente invención, es decir, el uso de urolitina A en afecciones inflamatorias de la piel.

Además, la solicitud estadounidense US20070197567A1 y la solicitud internacional WO2007133249A2 se refieren al uso de derivados de benzo[c]cromen-6-ona en el tratamiento de enfermedades de la piel asociadas con una proliferación celular excesiva y angiogénesis. La proliferación excesiva de fibroblastos y queratinocitos y la angiogénesis aumentada, descritas por los autores de las solicitudes anteriores, son secundarias a la inflamación de la piel, pero no son la causa subyacente. La causa inmediata de la dermatitis atópica y la psoriasis es la respuesta inmunitaria aumentada, por lo que la presente solicitud da a conocer el efecto antiinflamatorio de la urolitina A sobre la piel que puede usarse para tratar la dermatitis atópica y la psoriasis. Además, los estudios comparativos realizados por los presentes inventores confirmaron que ni la urolitina A, ni la 8-acetil-urolitina A, ni la 3-acetil-urolitina A mostraron actividad antiproliferativa sobre las células de fibroblastos de la piel humana a diferencia del derivado de urolitina B acetilado sometido a prueba.

La publicación "Anti-aging Effects of Urolithin A On Replicative Senescent Human Skin Fibroblasts" (Liu *et al.*, 2018) se refiere a los estudios del efecto de la urolitina A en los procesos de envejecimiento realizados en un modelo *in vitro* de fibroblastos humanos. Los autores demostraron que la urolitina A estimulaba la síntesis de colágeno e inhibía la expresión de ARNm para la metaloproteinasa de matriz 1, y además demostraron una actividad antioxidante dependiente de la activación del receptor Nrf2. Sin embargo, no se encontró inhibición del envejecimiento de los fibroblastos. Sin embargo, basándose en estudios *in vitro*, los autores sugieren el uso cosmético de la urolitina A en preparaciones antienvjecimiento. Los estudios anteriores se llevaron a cabo en células que forman parte del tejido cutáneo, pero el diseño del estudio no se refiere a fenómenos y mecanismos relacionados directamente con las inflamaciones de la piel.

Además, el uso tópico de urolitina A sobre la piel aún no se ha descrito para su aplicación en el tratamiento de la inflamación de la piel. Las solicitudes y publicaciones de patente citadas anteriormente se basan únicamente en estudios *in vitro* e *in vivo* tras la administración oral de urolitina A. La vía de administración de urolitina A es de particular importancia considerando que el metabolismo de la urolitina A se produce en el tracto gastrointestinal tras la administración oral. Hasta la fecha, no se han realizado estudios *in vivo* sobre el uso tópico de urolitinas A o de cualquiera de los otros compuestos pertenecientes al grupo de las urolitinas. Estos informes también se confirman con la publicación el 20 de marzo de 2018 de un comentario crítico de pioneros de la investigación sobre urolitinas (Tomas-Barberan *et al.*, 2018) y de expertos en la técnica del metabolismo de la microbiota intestinal, y un artículo de revisión publicado por ellos un año antes (Tomas-Barberan *et al.*, 2017) que indica claramente que la dirección de los efectos antiinflamatorios sobre la piel y la aplicación tópica de urolitinas A aún no se ha tenido en cuenta. Por tanto, los resultados obtenidos junto con la presente solicitud son el primer informe sobre el uso de urolitinas A, que es un metabolito de la microbiota intestinal, y una composición que comprende la misma para la inhibición local de la inflamación.

La publicación titulada "Psoriasis and Atopic Dermatitis" (Griffits Christopher E.M. *et al.*, *Dermatology and Therapy*, vol. 7, n.º S1, enero de 2017) se refiere al tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel, tales como la psoriasis y la dermatitis atópica, y presenta una descripción general del tratamiento terapéutico actual de la psoriasis y la dermatitis atópica como enfermedades inflamatorias crónicas de la piel mediante el uso de corticosteroides e inhibidores de calcineurina, además de la hidratación de la piel, la reparación de la barrera de la piel, la medicación antiinflamatoria y otros. Sin embargo, no se indica ni se sugiere el posible uso de urolitina A o derivados específicos de la misma.

Sumario de la invención

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de los presentes inventores era proporcionar una sustancia activa que fuera fácil de procesar, barata de fabricar y, por tanto, fácilmente disponible, y que redujera eficazmente el nivel de S100A8/A9, es decir, calprotectina, y estimulara la fosforilación de las cinasas ERK1/2, que fuera adecuada para la aplicación externa en la piel y las membranas mucosas, demostrando el efecto antiinflamatorio deseado, aliviando los síntomas de las inflamaciones y previniendo su aparición. Además, el objetivo de la invención era que la sustancia activa proporcionada fuera adecuada para su administración como una composición útil para el

autoconsumo por un sujeto que lo necesitara, y fuera persistente, no se degradara y fuera estable a lo largo del tiempo. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que este objetivo puede lograrse usando como principio activo tal composición de urolitina A, o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma.

- 5 El problema técnico que va a resolverse por la presente invención es una nueva composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel.

Esencia de la invención

10 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una o más sustancias auxiliares típicas y un principio activo, composición que comprende como principio activo urolitina A, 3,8-diacetato de urolitina A, preferiblemente urolitina A sintética, para su uso en el tratamiento, la inhibición y la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel y/o de las membranas mucosas, y en donde la composición es para administración externa tópica.

15 Los otros derivados de urolitina A que no forman parte de la invención pueden ser 3-formiato de urolitina A, 8-acetato de urolitina A, 3-acetato de urolitina A, 8-propionato de urolitina A, 8-butilato de urolitina A, 3,8-diisobutirato de urolitina A, 3,8-disalicilato de urolitina A, 8-benzoato de urolitina A, 8-citrato de urolitina A, 8-estearato de urolitina A, 3,8-palmitato de urolitina A, 8-oleato de urolitina A, 3,8-didodecanoato de urolitina A, preferiblemente el derivado de urolitina A puede seleccionarse del grupo de derivados diacilados. El principio activo está presente preferiblemente en la composición farmacéutica para su uso en una cantidad de desde aproximadamente el 0,0001 por ciento en peso hasta aproximadamente el 15 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición, preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 por ciento en peso hasta aproximadamente el 5 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición, más preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 por ciento en peso hasta aproximadamente el 2 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición, lo más preferiblemente del 1 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición.

20 Preferiblemente, la composición farmacéutica para su uso según la invención comprende además al menos un fármaco seleccionado del grupo de esteroides, inhibidores de calcineurina, fármacos con actividad antibacteriana, antifúngica o antiviral, preferiblemente seleccionado del grupo de esteroides o inhibidores de calcineurina, más preferiblemente el fármaco es un inhibidor de calcineurina.

25 En otra realización preferida, la urolitina A es el único principio activo presente en la composición farmacéutica para su uso.

30 Preferiblemente, en la composición farmacéutica para su uso según la invención, la al menos una sustancia auxiliar farmacéuticamente aceptable se selecciona de un portador y/o excipiente y/o diluyente y combinaciones de los mismos. La sustancia auxiliar farmacéuticamente aceptable preferida es uno o más de agentes protectores, adsorbentes, demulcentes, emolientes, conservantes, antioxidantes, hidratantes, agentes de tamponamiento y agentes solubilizantes.

35 En una realización preferida, la composición farmacéutica para su uso según la invención es para administración tópica externa al área enferma y está en el intervalo de desde aproximadamente 0,0001 g/cm² de área de superficie de la piel hasta aproximadamente 0,5 g/cm², preferiblemente desde 0,001 g/cm² hasta aproximadamente 0,2 g/cm² de área de superficie de la piel.

40 Preferiblemente, la composición farmacéutica para su uso según la invención está en forma líquida. De manera igualmente preferible, la composición farmacéutica para su uso según la invención está en forma de tónico, bálsamo, loción, espuma, más preferiblemente en forma de tónico.

45 De manera igualmente preferible, la composición farmacéutica para su uso según la invención está en forma semisólida, preferiblemente en forma de ungüento, crema, pasta, gel, preferiblemente en forma de ungüento o crema, más preferiblemente en forma de ungüento.

50 En una realización incluso más preferida, la composición farmacéutica para su uso según la invención está destinada a aplicarse al área enferma de manera manual, preferiblemente usando un gotero, una varilla de aplicación o un aplicador en aerosol.

55 En aún una realización adicional, la composición farmacéutica para su uso según la invención está en forma de un sistema terapéutico transdérmico tal como un parche intradérmico o un parche transdérmico.

60 La composición farmacéutica se usa preferiblemente en enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en inflamaciones de la piel, vasculitis, lupus eritematoso, dermatomiositis, esclerodermia, esclerosis múltiple, arteritis de células gigantes, psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis seborreica, dermatitis de contacto, urticaria, rosácea, dermatitis herpetiforme, liquen plano, hidradenitis supurativa, pitiriasis rosada de Gibert, hidrocistoma, aftas, dermatitis del pañal, acné juvenil, eczema de contacto no alérgico, paniculitis, celulitis. De manera particularmente

preferible, la composición farmacéutica para su uso según la invención se usa cuando la enfermedad de la piel y de las membranas mucosas es psoriasis o dermatitis atópica.

Descripción detallada de la invención

Tal como se indicó anteriormente, el objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende una o más sustancias auxiliares típicas y un principio activo, que como principio activo contiene urolitina A, 3,8-diacetato de urolitina A, preferiblemente urolitina A sintética, para su uso en el tratamiento, la inhibición y la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel y/o de las membranas mucosas, en donde la composición es para administración externa tópica.

Preferiblemente, el objeto de la presente invención es una composición farmacéutica para su uso según la invención que comprende urolitina A sintética, que en la naturaleza es un metabolito de la microbiota intestinal. La urolitina A posee propiedades antiinflamatorias usadas en el tratamiento de inflamaciones de la piel y de las membranas mucosas.

Más específicamente, la invención da a conocer una composición farmacéutica para su uso con urolitina A para su uso externo tópico en el tratamiento, la inhibición y la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel y de las membranas mucosas seleccionadas del grupo que consiste en: inflamaciones de la piel, vasculitis, lupus eritematoso, dermatomiositis, esclerodermia, esclerosis múltiple, arteritis de células gigantes, psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis seborreica, dermatitis de contacto, urticaria, rosácea, dermatitis herpetiforme, liquen plano, hidradenitis supurativa, pitiriasis rosada de Gibert, hidrocistoma, aftas, dermatitis del pañal, acné adolescente, eczema de contacto no alérgico, paniculitis, celulitis.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inflamación" debe entenderse según el significado generalmente aceptado como un conjunto de síntomas agudos o crónicos que persisten en el tiempo y están asociados a una respuesta inmunitaria aumentada en la piel y las membranas mucosas, incluyendo picor, ardor, sequedad y aspereza de la piel, sensación de constricción, tirantez de la piel, cualquier tipo de irritación o zonas de piel decolorada que requieran tratamiento o deban prevenirse. La inflamación en las membranas mucosas tiene una etiología similar y se manifiesta de manera similar y puede o no presentarse junto con la inflamación en la piel.

También se describen composiciones farmacéuticas para su uso que comprenden diversas formas de urolitina A, 3,8-diacetato de urolitina A, preferiblemente urolitina A sintética, junto con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

Una composición farmacéutica de este tipo para su uso, sin limitarse a la información proporcionada en el presente documento, puede contener la forma sólida que se mezcla con al menos un excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, preferiblemente la composición farmacéutica para su uso según la invención tiene la formulación final que es una forma líquida o semisólida y se administra habitualmente al sujeto que lo necesita en forma de espuma, tónico, ungüento, emulsión o crema.

El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento incluye un solo organismo biológico en el que puede producirse inflamación, incluyendo animales, y en particular animales superiores, y en particular vertebrados tales como mamíferos, y en particular seres humanos.

Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen almidón, goma arábiga, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. La composición farmacéutica para su uso puede contener además lubricantes tales como, por ejemplo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; conservantes tales como metilhidroxibenzoatos y propilhidroxibenzoatos; aromatizantes.

La composición farmacéutica tópica para su uso puede contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, incluyendo agentes protectores, adsorbentes, demulcentes, emolientes, conservantes, antioxidantes, hidratantes, agentes de tamponamiento, agentes solubilizantes, agentes penetrantes en la piel y tensioactivos.

Los agentes protectores y adsorbentes adecuados incluyen polvos para espolvorear, estearato de zinc, colodión, dimeticona, siliconas, carbonato de zinc, gel de aloe vera y otros productos de aloe vera, aceite de vitamina E, alantoína, glicerina, vaselina y óxido de zinc.

Los demulcentes adecuados incluyen benzoína, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y poli(alcohol vinílico).

Los emolientes adecuados incluyen grasas y aceites animales y vegetales, alcohol miristílico, alumbre, y acetato de aluminio.

Los conservantes adecuados incluyen compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de benzalconio, cloruro

- de bencetonio, cetrimida, cloruro de decualinio y cloruro de cetilpiridinio; agentes de mercurio tales como nitrato fenilmercúrico, acetato fenilmercúrico y timerosal; agentes alcohólicos, por ejemplo, clorobutanol, alcohol feniletílico y alcohol bencílico; ésteres antibacterianos, por ejemplo, ésteres de ácido parahidroxibenzoico; y otros antimicrobianos tales como clorhexidina, clorocresol, ácido benzoico y polimixina. El dióxido de cloro (ClO₂), preferiblemente dióxido de cloro estabilizado, es un conservante preferido para su uso en la composición tópica.
- 5 Los antioxidantes adecuados incluyen ácido ascórbico y sus ésteres, bisulfito de sodio, butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, tocoferoles y agentes quelantes tales como EDTA y ácido cítrico.
- 10 Los hidratantes adecuados incluyen glicerina, sorbitol, polietilenglicoles, urea, y propilenglicol.
- Los agentes de tamponamiento adecuados para su uso en la composición incluyen tampones acetato, tampones citrato, tampones fosfato, tampones ácido láctico, y tampones borato.
- 15 Los agentes solubilizantes adecuados incluyen cloruros de amonio cuaternario, ciclodextrinas, benzoato de bencilo, lecitina y polisorbatos.
- La composición farmacéutica tópica para su uso puede contener además fármacos del grupo de esteroides, inhibidores de calcineurina y/o inhibidores de fosfodiesterasa 4. La composición farmacéutica para su uso también puede ser una combinación de urolitina A y un fármaco/fármacos con actividad antibacteriana, antifúngica o antiviral. Los fármacos del grupo de esteroides incluyen propionato de clobetasol, betametasona, halobetasol, desoximetasona, halometasona, acetónido, hidrocortisona, mometasona. Los fármacos del grupo de inhibidores de calcineurina incluyen tacrólimus, pimecrólimus. Los fármacos del grupo de inhibidores de fosfodiesterasa 4 incluyen crisaborol. Los agentes antibacterianos incluyen sulfacetamida, bacitracina, neomicina, polimixina b, eritromicina, mupirocina, gentamicina, cloranfenicol. Los fármacos antifúngicos incluyen clotrimazol, econazol, miconazol, terbinafina, fluconazol, ketoconazol y anfotericina. Los fármacos antivirales incluyen aciclovir, penciclovir, valaciclovir, famciclovir.
- 20 25
- La composición farmacéutica para su uso según la invención puede administrarse convenientemente en forma de unidades de dosificación y puede prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica farmacéutica.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" debe significar una composición que incluye al menos un principio activo y al menos un componente que no es un principio activo (por ejemplo, carga o colorante) que hace que la composición sea adecuada para su uso en receptores específicos y efectivos entre los mamíferos (por ejemplo, seres humanos).
- 35 El término "principio activo" tal como se define con respecto al término "composición farmacéutica" debe entenderse como un componente de la composición farmacéutica que proporciona un beneficio farmacéutico primario, a diferencia de un "principio inactivo" que podría reconocerse esencialmente como que no proporciona un beneficio farmacéutico.
- 40 Los expertos en la técnica también entenderán que algunos de los compuestos pueden existir en forma libre o, cuando se apropiado, como un derivado o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos. Según eso, un derivado o profármaco farmacéuticamente aceptable incluye sales, ésteres, sales de tales ésteres o cualquier otro compuesto o derivado de adición farmacéuticamente aceptable que, cuando se administra a un paciente que lo necesita, puede proporcionar, directa o indirectamente, un compuesto tal como se describe en el presente documento o un metabolito, o un residuo del mismo.
- 45 El término "sal farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento se refiere a aquellas sales que son adecuadas para su uso en contacto con tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación o respuesta alérgica excesiva, y que guardan una relación beneficio/riesgo razonable. "Sal farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal o sal de un éster del compuesto no tóxica que, cuando se administra a un receptor, puede proporcionar, directa o indirectamente, un compuesto o un metabolito inhibidor o residuo del mismo.
- 50 55 El término profármaco, tal como se usa en el presente documento, se define como una sustancia farmacológica que se administra en una forma inactiva o menos activa. Después de la administración, se convierte en el cuerpo del paciente en una forma activa y eficaz.
- 60 Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica del compuesto incluyen ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, disoluciones, aerosoles, o parches.
- Además, en la presente descripción se contemplan parches transdérmicos que tienen la ventaja añadida de proporcionar una administración controlada del compuesto al cuerpo. Tales formas de dosificación se preparan disolviendo o dispensando el compuesto en el medio apropiado. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar la penetración del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse usando
- 65

una membrana de control de velocidad o dispersando el compuesto en una matriz de polímero o gel.

5 Las composiciones farmacéuticas incluyen composiciones farmacéuticas que contienen al menos un compuesto y/o una sal o solvato aceptable del mismo (por ejemplo, sal o solvato farmacéuticamente aceptable) como principio activo en combinación con al menos un portador o sustancia auxiliar (por ejemplo, portador farmacéutico o sustancia auxiliar) y pueden usarse en el tratamiento de las condiciones clínicas indicadas.

10 La urolitina A, que es el principio activo de la composición farmacéutica para su uso según la invención, puede combinarse con un portador en forma líquida o semisólida durante la preparación de la unidad de dosificación. El portador farmacéutico debe poder mezclarse homogéneamente con todos los componentes de la composición y debe ser tolerado por un receptor individual. Sin embargo, también pueden incluirse otros componentes fisiológicamente activos en la composición farmacéutica para su uso según la invención, si se desea, y cuando los componentes puedan mezclarse homogéneamente con los demás componentes de la composición. La composición farmacéutica para su uso puede prepararse por cualquier medio adecuado, habitualmente mezclando
15 uniformemente el/los compuesto(s) activo(s) con líquidos o un portador sólido finamente dividido, o ambos, en las proporciones deseadas, y luego, si es necesario, formando la mezcla resultante en la forma deseada.

La composición farmacéutica para su uso según la invención puede estar en forma líquida o semisólida.

20 La forma de la composición farmacéutica para su uso depende de la forma en que se prepara la composición.

Las realizaciones semisólidas de la composición farmacéutica tópica para su uso según la presente invención incluyen ungüentos, cremas, pastas, geles.

25 Las realizaciones líquidas de la composición farmacéutica tópica para su uso según la presente invención incluyen tónicos, bálsamos, lociones, aerosoles, espumas, disoluciones, emulsiones, suspensiones acuosas u oleosas.

30 Las dosificaciones y la frecuencia de dosificación serán determinadas por un experto en la técnica de la medicina dependiendo de las propiedades de una composición tópica particular y del tipo y la gravedad del trastorno dermatológico que va a tratarse o prevenirse. La cantidad de composición farmacéutica para su uso que va a aplicarse dependerá de factores tales como el compuesto en particular, la aplicación para la que está destinado, la vía de administración, y el estado del paciente que está tratándose; todos estos parámetros de dosificación están dentro del intervalo que puede determinar un experto habitual en la ciencia médica.

35 También debe tenerse en cuenta que la composición farmacéutica para su uso según la presente invención puede usarse en terapias combinadas, es decir, la composición farmacéutica para su uso puede administrarse simultáneamente, antes o después de uno o más tratamientos terapéuticos o médicos deseados. La combinación específica de terapias (tratamiento o procedimientos) que va a usarse en el régimen combinado tendrá en cuenta la compatibilidad del tratamiento y/o los procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que va a lograrse.
40 También debe tenerse en cuenta que las terapias usadas pueden permitir que se logre el efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto puede administrarse de manera concurrente con otro agente usado para tratar el mismo trastorno), o pueden permitir que se logren diferentes efectos (por ejemplo, combatir cualquier efecto nocivo). Los agentes terapéuticos adicionales usados en el presente documento, que habitualmente se administran en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o afección en particular, se conocen como
45 "apropiados para la enfermedad o afección que está tratándose".

50 La cantidad de agente terapéutico adicional presente en la composición farmacéutica para su uso según la presente invención no será mayor que la cantidad que normalmente se administraría en una composición que contenga ese agente terapéutico como único agente activo.

55 En general, el compuesto descrito anteriormente está presente en la formulación en una cantidad de desde aproximadamente el 0,0001 por ciento en peso hasta aproximadamente el 15 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición, preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 por ciento en peso hasta aproximadamente el 5 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición, más preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 por ciento en peso hasta aproximadamente el 2 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición.

60 Con el fin de tratar inflamaciones de la piel y de las membranas mucosas, la composición farmacéutica tópica para su uso según la presente invención se aplica por vía tópica directamente sobre el área enferma de cualquier manera convencional bien conocida en la técnica, por ejemplo, usando un gotero o varilla de aplicación, en forma de niebla usando un aplicador en aerosol, mediante parche intradérmico o transdérmico o mediante simple extensión mecánica de la composición farmacéutica para su uso según la invención sobre el área enferma.

65 Generalmente, la cantidad de la composición farmacéutica para su uso para administración tópica aplicada al área enferma oscila desde aproximadamente 0,0001 g/cm² de área de superficie de la piel hasta aproximadamente 0,5 g/cm², preferiblemente desde 0,001 g/cm² hasta aproximadamente 0,2 g/cm² de área de superficie de la piel.

Habitualmente, se recomienda una aplicación en la cantidad de 0,005 a 0,1 g/cm² diariamente durante la duración del tratamiento, administrada una o más veces al día, en dosis únicas o múltiples.

Breve descripción de las figuras

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- La figura 1 muestra cambios en el grosor de la oreja provocados por inflamación inducida (por DNCB) seguido de tratamiento local con urolitina al 0,2 y al 1,0 % o su portador de vaselina blanca. El grupo de control positivo fueron ratas tratadas con una composición de hidrocortisona al 1 %. El grupo de control negativo fueron ratas sin inflamación inducida. Los símbolos usados en las comparaciones a posteriori significan: # - vaselina frente a control negativo; † - hidrocortisona al 1 % frente a control negativo; & - urolitina A al 0,2 % frente a control negativo; γ - urolitina A al 1,0 % frente a control negativo; χ - hidrocortisona al 1 % frente a vaselina; * - urolitina A al 0,2 % frente a vaselina; Φ - urolitina A al 0,2 % frente a vaselina; Ω - urolitina A al 1,0 % frente a hidrocortisona al 1 %. Uno, dos o tres símbolos indican la significancia de las comparaciones a nivel de p<0,05, p<0,01, p<0,001, respectivamente.
- La figura 2 muestra cambios en la frecuencia de los reflejos de rascado provocados por la inflamación inducida (por DNCB) seguido de tratamiento local con urolitina a una dosis del 0,2 y del 1,0 % o su portador de vaselina blanca. El grupo de control positivo fueron ratas tratadas con una composición de hidrocortisona al 1 %. El grupo de control negativo fueron ratas sin inflamación inducida. Los símbolos usados en las comparaciones a posteriori significan: # - vaselina frente a control negativo; † - hidrocortisona al 1 % frente a control negativo; & - urolitina A al 0,2 % frente a control negativo; γ - urolitina A al 1,0 % frente a control negativo; χ - hidrocortisona al 1 % frente a vaselina; * - urolitina A al 0,2 % frente a vaselina; Φ - urolitina A al 0,2 % frente a vaselina; Ω - urolitina A al 1,0 % frente a hidrocortisona al 1 %. Uno, dos o tres símbolos indican la significancia de las comparaciones a nivel de p<0,05, p<0,01, p<0,001, respectivamente.
- La figura 3 muestra el número total de leucocitos [n/1×10⁹] y su porcentaje en ratas del grupo de control negativo (sin inflamación inducida), el grupo de control relevante (con dermatitis atópica inducida, expuesto a vaselina), el grupo de control positivo (con dermatitis atópica inducida, expuesto a hidrocortisona al 1 %) y grupos de ratas con dermatitis atópica inducida, expuestos a los compuestos activos sometidos a prueba (urolitina A al 0,2 y al 1,0 %). Los símbolos usados en las comparaciones a posteriori significan: # - vaselina frente a control negativo; † - hidrocortisona al 1 % frente a control negativo; & - urolitina A al 0,2 % frente a control negativo; γ - urolitina A al 1,0 % frente a control negativo; * - urolitina A al 0,2 % frente a vaselina; Φ - urolitina A al 0,2 % frente a vaselina. Uno, dos o tres símbolos indican la significancia de las comparaciones a nivel de p<0,05, p<0,01, p<0,001, respectivamente.
- La figura 4 muestra el número total de monocitos [n/1×10⁹] y su porcentaje en ratas del grupo de control negativo (sin inflamación inducida), el grupo de control relevante (con dermatitis atópica inducida, expuesto a vaselina), el grupo de control positivo (con dermatitis atópica inducida, expuesto a hidrocortisona al 1 %) y grupos de ratas con dermatitis atópica inducida, expuestos a los compuestos activos sometidos a prueba (urolitina al 0,2 y al 1,0 %). Los símbolos usados en las comparaciones a posteriori significan: # - vaselina frente a control negativo; † - hidrocortisona al 1 % frente a control negativo; & - urolitina A al 0,2 % frente a control negativo; γ - urolitina A al 1,0 % frente a control negativo; * - urolitina A al 0,2 % frente a vaselina; Φ - urolitina A al 0,2 % frente a vaselina. Uno, dos o tres símbolos indican la significancia de las comparaciones a nivel de p<0,05, p<0,01, p<0,001, respectivamente.
- La figura 5 muestra el número total de neutrófilos [n/1×10⁹] y su porcentaje en ratas del grupo de control negativo (sin inflamación inducida), el grupo de control relevante (con dermatitis atópica inducida, expuesto a vaselina), el grupo de control positivo (con dermatitis atópica inducida, expuesto a hidrocortisona al 1 %) y grupos de ratas con dermatitis atópica inducida, expuestos a los compuestos activos sometidos a prueba (urolitina al 0,2 y al 1,0 %). Los símbolos usados en las comparaciones a posteriori significan: # - vaselina frente a control negativo; † - hidrocortisona al 1 % frente a control negativo; & - urolitina A al 0,2 % frente a control negativo; γ - urolitina A al 1,0 % frente a control negativo; * - urolitina A al 0,2 % frente a vaselina; Φ - urolitina A al 0,2 % frente a vaselina. Uno, dos o tres símbolos indican la significancia de las comparaciones a nivel de p<0,05, p<0,01, p<0,001, respectivamente.
- La figura 6 muestra el número total de linfocitos [n/1×10⁹] y su porcentaje en ratas del grupo de control negativo (sin inflamación inducida), el grupo de control relevante (con dermatitis atópica inducida, expuesto a vaselina), el grupo de control positivo (con dermatitis atópica inducida, expuesto a hidrocortisona al 1 %) y grupos de ratas con dermatitis atópica inducida, expuestos a los compuestos activos sometidos a prueba (urolitina al 0,2 y al 1,0 %). Los símbolos usados en las comparaciones a posteriori significan: # - vaselina frente a control negativo; † - hidrocortisona al 1 % frente a control negativo; & - urolitina A al 0,2 % frente a control negativo; γ - urolitina A al 1,0 % frente a control negativo; * - urolitina A al 0,2 % frente a vaselina; Φ - urolitina A al 0,2 % frente a vaselina. Uno, dos o tres símbolos indican la significancia de las comparaciones a nivel de p<0,05, p<0,01, p<0,001, respectivamente.
- La figura 7 muestra un gráfico que muestra el efecto de la urolitina A (UA), la urolitina B (UB) y la iso-urolitina A (iUA)

sobre el nivel extracelular de la proteína S100A8/A9. Las urolitinas se incubaron a tres concentraciones (40, 10 y 1 μM) con neutrófilos aislados de sangre periférica humana. Significación estadística: ** - $p < 0,001$ frente al control estimulado (prueba de Dunnett); # - significación estadística ($p < 0,001$) frente al control no estimulado; ST - control estimulado; NST - control no estimulado.

5 La figura 8 muestra la histología de las lesiones de la piel en ratas en el modelo de dermatitis atópica (lesiones tratadas con la composición de urolitina A). Hiperplasia epidérmica leve, infiltración leve de células mononucleares (mastocitos) y neutrófilos. Una ligera infiltración de células inflamatorias alrededor de los vasos sanguíneos.

10 La figura 9 muestra la histología de las lesiones de la piel de ratas en el modelo de dermatitis atópica (lesiones tratadas con vaselina). Hiperplasia epidérmica significativa, hiperqueratosis epidérmica significativa e infiltración significativa de células mononucleares (mastocitos).

15 La figura 10 muestra la histología de las lesiones de la piel de ratas en el modelo de dermatitis atópica (lesiones tratadas con vaselina). La espongiosis epidérmica es el resultado de la separación de los queratinocitos inalterados por la acumulación de efusión entre las células.

La figura 11 muestra la histología normal de la piel en una rata sin dermatitis atópica inducida.

20 La figura 12 muestra gráficos que indican el efecto de la urolitina A (UA) y sus derivados acilados (SG1, SG2, SG3, SG4, SG1 m, SG2 m, SG3 m) sobre la producción de IL-8, TNF-alfa e IL-1beta por neutrófilos aislados de sangre periférica humana. La urolitina A y sus derivados acilados se incubaron con neutrófilos a 5, 10 y 40 μM , luego las células se estimularon con LPS a 100 ng/ml durante 24 h. Significación estadística: * - $p < 0,001$ frente al control estimulado (prueba de Dunnett). SC - control estimulado, NSC - control no estimulado.

25 La figura 13 muestra un gráfico que indica el efecto de la iso-urolitina A (iUA), la urolitina A (UA), la urolitina B (UB), sus respectivos glucurónidos (GiUA, GUA, GUB), derivados acetilados de urolitina A (SG1 y SG1_mono) y 3-acetil-urolitina B sobre la secreción de TNF-alfa por macrófagos obtenidos de la línea celular THP-1. Las urolitinas y sus derivados se incubaron con macrófagos a una concentración de 40 μM . Se usó partenolida a una concentración de 5 μM como control positivo. Significación estadística: disminución estadísticamente significativa *- $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$ frente al control estimulado (prueba de Dunnett); aumento estadísticamente significativo #- $p < 0,05$, ## - $p < 0,001$ frente al control estimulado (prueba de Dunnett).

30 La figura 14 muestra un gráfico que indica el efecto de la iso-urolitina A (iUA), la urolitina A (UA), la urolitina B (UB), sus respectivos glucurónidos (GiUA, GUA, GUB) sobre la expresión de ARNm para TNF-alfa por macrófagos obtenidos de la línea celular THP-1. Las urolitinas y sus derivados se incubaron con macrófagos a una concentración de 40 μM , luego las células se estimularon con LPS a una concentración de 100 ng/ml durante 6 h. Se usó partenolida a una concentración de 5 μM como control positivo. Significación estadística: disminución estadísticamente significativa *- $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$ frente al control estimulado (prueba de Dunnett); aumento estadísticamente significativo #- $p < 0,05$, ## - $p < 0,001$ frente al control estimulado (prueba de Dunnett).

35 La figura 15 muestra un gráfico que indica el efecto de la iso-urolitina A (iUA), la urolitina A (UA), la urolitina B (UB), sus respectivos glucurónidos (GiUA, GUA, GUB) sobre la fosforilación de ERK1/2 en macrófagos obtenidos de la línea celular THP-1. Las urolitinas y sus derivados se incubaron con macrófagos a una concentración de 40 μM , luego las células se estimularon con LPS a una concentración de 10 ng/ml durante 35 min. Se usó partenolida a una concentración de 5 μM como control positivo. Significación estadística: disminución estadísticamente significativa *- $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$ frente al control estimulado (prueba de Dunnett); aumento estadísticamente significativo #- $p < 0,05$, ## - $p < 0,001$ frente al control estimulado (prueba de Dunnett).

40 La figura 16 muestra un gráfico que indica el efecto de la iso-urolitina A (iUA), la urolitina A (UA), la urolitina B (UB), sus respectivos glucurónidos (GiUA, GUA, GUB) sobre la secreción de TNF-alfa por macrófagos obtenidos de monocitos aislados de sangre periférica humana. Las urolitinas y sus derivados se incubaron con macrófagos a una concentración de 40 μM , luego las células se estimularon con LPS a una concentración de 100 ng/ml durante 24 h. Significación estadística: disminución estadísticamente significativa *- $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$ frente al control estimulado (prueba de Dunnett); aumento estadísticamente significativo #- $p < 0,05$, ## - $p < 0,001$ frente al control estimulado (prueba de Dunnett).

45 La figura 17 muestra un gráfico que indica el efecto de la urolitina A (UA), la urolitina B (UB) y la iso-urolitina A (iUA), derivados acetilados de la urolitina A (SG1 y SG1_mono) y la 3-acetil-urolitina B sobre la proliferación de fibroblastos de piel humana. Las urolitinas se incubaron a una concentración de 40 μM con células de fibroblastos humanos. Significación estadística: *** - $p < 0,001$ frente al control (prueba de Dunnett).

50 La figura 18 muestra las estructuras de los derivados acilo de la urolitina A sometidos a prueba - SG1, SG2, SG3, SG4, SG1 m, SG2 m, SG3 m.

65

La figura 19 muestra las estructuras de los glucurónidos de urolitina sometidos a prueba. 3-O-Glucurónido de iso-urolitina A (GiUA), una mezcla de 3-O-glucurónido de urolitina A y 8-O-glucurónido de urolitina A (GUA), 3-O-glucurónido de urolitina B (GUB).

5 Metodología de la investigación

Evaluación in vivo de la eficacia de la urolitina A en el tratamiento de la dermatitis atópica en un modelo de rata

Materiales y métodos:

10 El modelo animal en el que se ha demostrado la actividad de la urolitina A puede estar relacionado con cualquier trastorno inflamatorio de la piel. Es similar a las indicaciones de uso de la hidrocortisona, que se usó como control positivo en el estudio.

15 La urolitina A se obtuvo por síntesis según Bialonska *et al.* (Bialonska *et al.*, 2009) o se adquirió de Sigma-Aldrich. El ungüento que contenía urolitina A se preparó emulsionando la sustancia pesada en un vehículo sólido (vaselina blanca) usando un aparato Unguator.

20 Para las pruebas se usaron ratas Wistar de 5-6 semanas de edad (al inicio del experimento) mantenidas en condiciones estándar con libre acceso a alimento y agua. Los animales se dividieron en 5 grupos, 8 individuos en cada grupo. Para preparar la composición de 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) que induce la inflamación, se disolvió DNCB en etanol al 70 % hasta una concentración final del 1,5 % (p/v). La composición terapéutica era un ungüento a base de vaselina blanca con urolitina A al 0,2 % o al 1,0 % añadida. El ungüento de control era vaselina blanca sin urolitina A añadida.

25 La inducción de dermatitis atópica crónica implicó una infiltración local de 9 veces con 60 µl de 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) al 1,5 % en cada superficie (externa e interna) de la oreja derecha durante 3 semanas (3 veces por semana). El control negativo fue la oreja derecha de ratas sin inflamación inducida.

30 El tratamiento de la dermatitis atópica con una composición de urolitina al 0,2 % o al 1,0 % y vaselina blanca (control) o una composición de hidrocortisona al 1,0 % (control positivo) se inició ocho días después de la sensibilización (un día antes de la cuarta aplicación de DNCB). Se aplicaron ungüentos con el fármaco apropiado añadido para el grupo dado en un volumen total de aproximadamente 20 µl en cada superficie de la oreja un día antes y 6 horas después de cada aplicación de DNCB (durante un periodo de 3 semanas). El grupo de control negativo consistió en ratas sin inflamación inducida y tratadas con vaselina blanca en un régimen análogo a la composición de urolitina A o hidrocortisona.

Evaluación de la eficacia de la composición

40 Medición del grosor de la oreja.

El grosor de la oreja se evaluó usando un mini compás calibrador electrónico el día antes de inducir la inflamación (día 0) y luego los días 4 y 8 antes del tratamiento y los días 4, 8, 12, 16, 22 y 26 de la terapia con la composición de urolitina A (los días 12, 16, 20, 24, 28 y 32 después de inducir la inflamación, respectivamente).

45 Medición del nivel de prurito.

50 La medición del nivel de prurito (tal como se mide mediante los reflejos de rascado) se evaluó como la frecuencia total de los reflejos de rascado durante 10 minutos inmediatamente después de la aplicación de DNCB en los días 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 y 32 del experimento. El rascado se definió como un reflejo único o una serie de varios reflejos de rascado con una pata dirigida al lugar de aplicación de DNCB.

Morfología de la sangre periférica.

55 Se extrajeron muestras de sangre de 2 ml en jeringas (que contenían heparina como anticoagulante) del corazón bajo anestesia general (isoflurano) el día 32 del experimento. La prueba se realizó usando el analizador hematológico automatizado DIATRON. El análisis de sangre periférica incluyó la evaluación de elementos morfológicos en la sangre: eritrocitos, leucocitos y trombocitos y la determinación del número y porcentaje de diferentes tipos de leucocitos (WBC), así como los valores de los indicadores eritrocíticos: hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH) y concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC).

Evaluación histológica

65 La evaluación histológica se realizó en la piel de las orejas de ratas con inflamación inducida y en la piel de las orejas de ratas de control tomadas el día 32 del experimento. La evaluación se realizó en cortes de piel de 20 µm

teñidos con hematoxilina/eosina (H&E) convencional para evaluar la infiltración de células inflamatorias y con azul de toluidina para evaluar la presencia de mastocitos.

Análisis estadístico

5 Los resultados experimentales obtenidos se analizaron usando el programa Statistica 7.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EE. UU.) y se presentaron como valores medios \pm EE. La significación estadística se estableció en $P \leq 0,05$. Los resultados con distribución normal establecida en la prueba de D'Agostin y Pearson se prepararon usando análisis de varianza (ANOVA) de dos o tres factores. El análisis a posteriori paramétrico para puntos temporales individuales se realizó usando la prueba de Bonferroni.

Resultados

15 *Cambios inflamatorios locales (hinchazón e hiperemia del oído) y sistémicos (cambios en la morfología de la sangre) inducidos por DNCB:*

Cambios locales.

20 El análisis usando análisis de varianza (ANOVA) de dos factores mostró que el periodo de 8 días de sensibilización de la piel de la oreja usando DNCB al 1,5 % provocó inflamación manifestada como edema significativo [$p < 0,001$ - efecto principal de DNCB] y rápido [$p < 0,001$ - interacción DNCB \times tiempo] y enrojecimiento del pabellón auricular (figura 1).

Rascado.

25 La evaluación del comportamiento reveló reflejos de rascado en respuesta a la inflamación inducida por DNCB desde el día 4 de inducción de la inflamación ($p < 0,05$). El ANOVA de 2 factores realizado durante todo el periodo de inducción de la inflamación mostró que este efecto fue similar en todos los grupos antes del inicio del tratamiento (hasta el día 8) con respecto a la intensidad y al aumento de la frecuencia del reflejo durante el periodo de sensibilización estudiado.

Efecto de la terapia tópica con urolitina A sobre los cambios inflamatorios inducidos por DNCB:

Inhibición de cambios locales.

35 El edema de oído, usado como parámetro de dermatitis atópica, se redujo después de la introducción de la terapia local tanto con urolitina A [$p < 0,001$] como con hidrocortisona [$p < 0,01$] (figura 1), y el análisis mediante ANOVA de 2 factores mostró que el efecto fue más fuerte cuando se usó urolitina [$F(1,28) = 6,16; p < 0,05$]. También se encontró un efecto significativo para la dosis de urolitina aplicada, que fue más eficaz a una concentración del 1 % [$p < 0,05$ - comparación de las dosis de urolitina entre sí]. El análisis de varianza realizado por separado para cada dosis de urolitina también mostró que se obtuvo un efecto antiinflamatorio significativamente mayor en comparación con la hidrocortisona sólo a una concentración del 1 % [$p < 0,05$ - urolitina A al 1 % frente a hidrocortisona al 1 %] en ausencia de una eficacia significativamente mayor a una dosis del 0,2 % [Urolitina A al 0,2 % frente a hidrocortisona al 1 %].

45 Efecto de interacción significativa: el compuesto antiinflamatorio sometido a prueba (urolitina A frente a hidrocortisona) \times tiempo indica un perfil temporal diferente del efecto antiinflamatorio de las composiciones sometidas a prueba, caracterizado por una mayor eficacia terapéutica de la hidrocortisona en el periodo inicial de terapia (hasta 12 días) en comparación con la urolitina, que fue más eficaz en el periodo de tratamiento posterior [$p < 0,01$] (desde el día 12 hasta el día 28 de tratamiento) tanto a la dosis del 0,2 como a la del 1 %. También se encontró una disminución gradual del edema cuando se usó vaselina como portador de sustancias activas [$p < 0,01$ - efecto principal del tiempo], sin embargo, este efecto fue significativamente más débil en comparación con el uso de las sustancias activas.

55 Eficacia antipruriginosa (rascado).

60 La evaluación del comportamiento mostró una reducción en la tasa de rascado con el uso de urolitina A [$p < 0,001$] e hidrocortisona [$p < 0,01$], siendo el efecto más fuerte en comparación con la urolitina [$p < 0,05$ - efecto] (figura 2). El mayor efecto de inhibición de los reflejos de rascado por urolitina está determinado por el uso de una dosis apropiada de urolitina, que fue más eficaz a una concentración del 1 % [$p < 0,05$ - comparación de las dosis de urolitina entre sí]. El análisis de varianza realizado por separado para cada dosis de urolitina también mostró que se obtuvo una inhibición significativamente mayor de los reflejos de rascado en comparación con la hidrocortisona sólo a una concentración del 1 % [$p < 0,05$ - urolitina A al 1 % frente a hidrocortisona al 1 %] en ausencia de una eficacia significativamente mayor a una dosis del 0,2 % [$p = 0,39$ - urolitina A al 0,2 % frente a hidrocortisona al 1 %]. La falta de significación del efecto de interacción con respecto a los cambios en la frecuencia de los reflejos de rascado en el intervalo de tiempo estudiado dependiendo de la composición antiinflamatoria sometida a prueba (interacción:

urolitina A frente a hidrocortisona × tiempo] indica que, en contraste con la mayor eficacia antiedema de la hidrocortisona en el periodo inicial de terapia (hasta el día 12) en comparación con la urolitina, este efecto no se encontró en relación con la inhibición de los reflejos de rascado. También se encontró una disminución gradual de los reflejos de rascado después del uso de vaselina como portador de sustancias activas [$p < 0,01$ - efecto principal del tiempo], pero el efecto fue significativamente más débil en comparación con las sustancias activas usadas.

Cambios en la morfología sanguínea debido a la dermatitis atópica y al tratamiento con composiciones antiinflamatorias:

Sistema de glóbulos blancos.

El mayor nivel de leucocitos en las ratas de control tratadas con DNCB se debió principalmente a un aumento en el recuento total de monocitos (superando las normas prescritas para la rata) y neutrófilos (manteniendo las normas prescritas para la rata), y por consiguiente a un aumento en su porcentaje en el parámetro general de WBC. El grupo de ratas con inflamación inducida y tratadas con vaselina blanca como portador de urolitina A también se caracterizó por un aumento general en el recuento de linfocitos en el agrupamiento total de leucocitos, sin embargo, debido al aumento en los recuentos de monocitos y neutrófilos, su porcentaje fue menor que en las ratas de control. El tratamiento con hidrocortisona al 1 % como control positivo dio como resultado una reducción significativa en WBC ($p < 0,05$).

También se obtuvo una disminución del nivel de WBC con la composición de urolitina A sometida a prueba, que a una concentración de sustancia activa del 0,2 % redujo los valores de WBC de manera similar a la hidrocortisona al 1 % [$p < 0,05$], mientras que a una concentración del 1 % a $p < 0,01$. Sin embargo, el mayor nivel de significación del efecto obtenido con urolitina al 1 % no dio como resultado un efecto significativamente mayor de inhibición del crecimiento de WBC por esta composición en comparación con la hidrocortisona al 1 %. Cabe señalar que la inhibición del crecimiento del nivel de WBC tanto por la hidrocortisona al 1 % como por la composición de urolitina A sometida a prueba en ambas concentraciones usadas, es decir, 0,2 y 1 %, no fue completamente eficaz. Los valores finales de WBC se mantuvieron en un nivel más alto en comparación con los grupos de control negativo de ratas (sin inducir dermatitis atópica).

Tal como se mencionó anteriormente, el aumento del nivel de WBC inducido por la dermatitis atópica estuvo condicionado por un aumento en la población de monocitos, neutrófilos y linfocitos. Sin embargo, la inhibición de este proceso por la hidrocortisona se produjo únicamente mediante la reducción de la población de monocitos y neutrófilos, mientras que, debido a una gran variación en los niveles de linfocitos en el grupo tratado con esta composición de control, no hubo diferencias significativas en su nivel en comparación con el grupo de control tratado con vaselina. En comparación con la composición de hidrocortisona al 1 %, la urolitina A usada en ambas concentraciones inhibió significativamente el aumento del nivel de las tres poblaciones de leucocitos.

Sistema de glóbulos rojos.

En la evaluación de los parámetros de los glóbulos rojos, se observó una disminución de la concentración de hemoglobina en los eritrocitos (MCH y MCHC) en el grupo de ratas con dermatitis atópica inducida y tratadas con la composición de hidrocortisona al 1 % [$p < 0,05$]. Sin embargo, este efecto no se observó en los grupos con dermatitis atópica inducida y tratados con la composición de urolitina A en las dos concentraciones usadas, 0,2 y 1,0 %, y el grupo de control expuesto sólo a vaselina. Esto demuestra que la disminución del nivel de hematocrito en el primero de los grupos analizados fue provocada por la acción directa de la hidrocortisona y no fue el resultado de la dermatitis atópica.

El grupo de ratas tratadas con la composición de hidrocortisona al 1 % también se caracterizó por una disminución en el nivel del parámetro RDW [$p < 0,05$], que no se observó en los otros grupos de investigación y que, por consiguiente, puede explicarse por la acción de la hidrocortisona.

Los cambios observados en los niveles de hematocrito y RDW se encontraban dentro de los valores fisiológicos en la rata. Sin embargo, cabe señalar que, aunque los índices en % de RDW y fl no son clínicamente significativos, con una disminución concurrente de la concentración de hemoglobina en los eritrocitos y un mantenimiento de los valores normales de RBC, puede haber una tendencia a la anemia hipocromática provocada por el efecto a largo plazo de la hidrocortisona.

En cuanto a los demás valores de los parámetros del sistema eritrocítico, es decir, RBC, HGB y HCT, MCV, no se observaron cambios provocados por la inflamación atópica y el efecto tanto de la hidrocortisona como de la urolitina.

Sistema plaquetario.

En la evaluación de los parámetros plaquetarios se encontró un aumento en el número de trombocitos (PLT - 1×10^9) y trombocrito (% de PCT) en el grupo de ratas con dermatitis atópica inducida, siendo el aumento ligeramente mayor y alcanzando valores significativamente más altos en comparación con el grupo de control negativo [$p < 0,05$]

sólo en ratas tratadas con hidrocortisona al 1 % (PLT), y para el parámetro % de PCT en ratas tratadas con vaselina [$p < 0,05$] o hidrocortisona al 1 % [$p < 0,01$].

5 Otros parámetros del sistema plaquetario, es decir, el MPV (fl) y el PDW (fl), así como el PDWcv (%), no cambiaron como resultado de la dermatitis atópica o del tratamiento realizado con hidrocortisona o urolitina.

Los cambios observados en el recuento de trombocitos (PLT - 1×10^9) y el trombocrito (% de PCT) estaban dentro de los valores fisiológicos en ratas.

10 *Efecto de la urolitina A sobre los niveles de S100A8/A9, IL-8, TNF-alfa e IL-1beta secretadas por neutrófilos aislados de sangre periférica humana*

15 Con el fin de estudiar comparativamente la actividad biológica de las urolitinas y sus derivados, estos compuestos se obtuvieron mediante síntesis química, y luego se examinó su actividad contra la liberación de calprotectina por neutrófilos estimulados. Se extrajo sangre periférica de donantes sanos (con edades de 20-35 años) en el Centro Regional de Donación y Tratamiento de Sangre (Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa) en Varsovia. El estudio se realizó según los principios de la Declaración de Helsinki. Los donantes eran no fumadores y no tomaban ningún medicamento. Los neutrófilos se aislaron usando un método convencional (Piwowarski *et al.*, 2014a). Luego, los neutrófilos se suspendieron en HBSS. Se añadieron 50 μ l de urolitina A, urolitina B o iso-urolitina A a la concentración adecuada (para conseguir concentraciones finales de 40, 10 y 1 μ M) y 10 μ l de disolución de LPS (concentración final de 10 ng/ml) a 440 μ l de suspensión celular (3×10^5 células/ml). Las células se incubaron a 37 °C durante 30 min, luego se centrifugaron a 4 °C, 400 rcf durante 10 min. El experimento se llevó a cabo en muestras de sangre tomadas de 4 donantes diferentes por duplicado. El efecto de las urolitinas en la producción de S100A8/A9 se determinó usando el método inmunoquímico ELISA (R&D Systems).

25 Después del aislamiento, los neutrófilos se suspendieron en medio RPMI 1640 complementado con L-glutamina, HEPES y FBS al 10 % y se incubaron con urolitina A y sus derivados acilados (SG1, SG2, SG3, SG4, SG1_m, SG2_m, SG3_m) a una concentración de 40 μ M durante 1 hora antes de la estimulación con LPS de *Escherichia coli* (100 ng/ml). Después de 24 horas, se determinaron los niveles de IL-8, TNF-alfa e IL-1beta mediante el método inmunoquímico de ELISA (BD biosciences). El efecto sobre la viabilidad de los neutrófilos se evaluó usando tinción con anexina V y yoduro de propidio.

Resultados:

35 Entre los compuestos sometidos a prueba pertenecientes al grupo de las urolitinas que se incubaron con neutrófilos humanos, la urolitina A fue el único que provocó una disminución significativa del nivel extracelular de la proteína S100A8/A9 (calprotectina). La actividad demostrada fue dependiente de la concentración. También debe destacarse que hasta ahora la urolitina A es la única sustancia para la que se han encontrado propiedades de reducción del nivel extracelular de S100A8/A9.

40 La urolitina A mostró inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias, IL-8, TNF-alfa e IL-1beta, por los neutrófilos humanos. La unión del grupo acilo a la molécula de urolitina A provocó cambios significativos en su actividad, con una mayor inhibición de la respuesta inflamatoria observada sólo para SG_1, SG1_m y SG2_m. Otros derivados o bien no mostraron ningún efecto o bien estaban aumentando la respuesta inflamatoria mediada por los neutrófilos.

Ninguno de los compuestos sometidos a prueba mostró influencia alguna sobre la viabilidad de los neutrófilos.

50 *El efecto de la urolitina A sobre la viabilidad de los fibroblastos humanos in vitro.*

Los fibroblastos NHDF (fibroblastos de piel humana normal) se cultivaron en el medio DMEM complementado con FBS al 10 % y una mezcla de antibióticos (penicilina y estreptomina) a 37 °C, el 5 % de CO₂. Las células se incubaron con urolitina A, urolitina B, iso-urolitina A y derivados de urolitina acetilados A-SG1 y SG1_m, así como 3-acetil-urolitina B a una concentración de 40 μ M durante 24 horas. Después de la incubación con los compuestos, las células se lavaron dos veces con medio templado. El efecto sobre la viabilidad celular se evaluó usando una prueba MTT convencional.

60 La urolitina A, la urolitina B, la iso-urolitina A y los derivados de urolitina acetilados A-SG1 y SG1_mono no afectaron a la viabilidad de los fibroblastos humanos. La 3-acetil-urolitina B redujo la viabilidad celular en un $27,4 \pm 10,4$ %.

El efecto de la urolitina A sobre la producción y expresión de la citocina proinflamatoria TNF-alfa y la fosforilación de la proteína cinasa ERK en un modelo de macrófagos humanos obtenidos a partir de monocitos de la línea celular THP-1.

65 Los monocitos de la línea THP-1 se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10 % y glutamina

2 mM. Para la transformación de los monocitos en macrófagos, las células se trataron con 12,5 ng/ml de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) durante 48 horas, luego se lavaron e incubaron durante 24 horas en un medio de cultivo sin PMA. Después de este tiempo, se añadieron a las células urolitina A, urolitina B, iso-urolitina A y los glucurónidos correspondientes (GUA, GUB y GiUA) a una concentración de 40 μ M. Después de 1 hora de incubación con los compuestos, las células se estimularon con LPS de *Escherichia coli* (10 ng/ml).

Las células se incubaron durante 6 horas para evaluar el nivel de producción de TNF-alfa, las células se incubaron durante 24 horas para evaluar la expresión de ARNm para TNF-alfa, las células se incubaron durante 35 minutos para evaluar el efecto sobre la fosforilación de ERK1/2.

El nivel de TNF-alfa en el medio de cultivo se determinó mediante el método inmunoquímico ELISA (BD biosciences). La evaluación de la expresión de ARNm para TNF-alfa se realizó mediante PCR en tiempo real. Después de 24 horas de incubación, el ARN se aisló usando el kit NucleoSpin RNA Clean-up (Macherey-Nagel). La cantidad y calidad del ARN aislado se determinó usando el dispositivo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). El nivel de expresión de ARNm para TNF- α se determinó usando el kit Brilliant II SYBR Green QPCR y el termociclador Aria Mx Real-Time PCR (Agilent Technologies). Los siguientes se usaron como cebadores para TNF-alfa:

directo: 5'-GGCCTCTGTGCCTTCTTTTG-3',

inverso: 5'-CCTCAGCAATGAGTGACAGT-3'.

Se usó beta-actina (ACTB) como gen de mantenimiento;

cebador directo: 5'-TTGCCGACAGGATGCAGAAGGA-3',

inverso: 5'-AGGTGGACAGCGAGGCCAGGAT-3'.

La fosforilación de ERK1/2 se evaluó mediante inmunotransferencia de tipo Western. Después de 35 minutos de estimulación con LPS, se realizó la lisis celular usando cOplete™ Lysis-M (Roche) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche). Las proteínas se separaron en un gel de SDS-PAGE al 12,5 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la membrana se incubó con anticuerpos primarios de conejo: anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology), anti-pERK1/2, Thr202/Tyr204 (Cell Signaling Technology), anti-beta actina (Abcam). El anticuerpo secundario fue anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Abeam). La membrana se reveló usando el reactivo ECL SignalFire (Cell Signaling Technology) y se visualizó usando la cámara PXi 4 Touch (SYNGENE).

Se analizaron la urolitina A, la urolitina B, la iso-urolitina A y sus glucurónidos correspondientes a una concentración de 40 μ M para determinar sus efectos sobre la viabilidad de los macrófagos usando una prueba MTT convencional.

Resultados:

En los estudios realizados sobre la inhibición de la respuesta inflamatoria en un modelo de macrófagos humanos obtenidos a partir de monocitos de la línea celular THP-1, se demostró que la inhibición de la producción de la citocina proinflamatoria TNF-alfa era característica sólo de la urolitina A y sus derivados monoacetilados SG1 y SG1_mono. La urolitina B y su derivado acetilado no mostraron ninguna actividad (figura 13). Paralelamente, la iso-urolitina A estudiada con grupos fenol en las posiciones 3 y 9 estimuló la producción de TNF-alfa. Los derivados glucurónidos GUA, GiUA y GUB de las urolitinas no mostraron ninguna actividad. Además, se ha demostrado que la urolitina A tiene un efecto inhibitor sobre la expresión del ARNm de TNF-alfa, mientras que la urolitina B fue inactiva y la iso-urolitina A estimuló la expresión del ARNm de esta citocina.

Los estudios de la ruta de señalización de MAPK han demostrado que la estimulación de la fosforilación de la cinasa ERK1/2 por la urolitina A está involucrada en la actividad que inhibe la producción de TNF-alfa. Esta actividad fue específica para la urolitina A, ya que la urolitina B no mostró tal actividad, mientras que la iso-urolitina A fue mucho menos activa. Los derivados glucurónidos fueron inactivos.

Efecto de la urolitina A sobre la producción de la citocina proinflamatoria TNF-alfa en un modelo de macrófagos humanos obtenidos a partir de monocitos aislados de sangre periférica humana

Los monocitos se aislaron de sangre periférica humana mediante un método convencional usando sedimentación con dextrano y centrifugación en gradiente de Ficoll Hypaque. Después del aislamiento, los monocitos se suspendieron en medio RPMI 1640 complementado con L-glutamina, HEPES, estreptomycin, anfotericina y gentamicina, y suero autólogo al 20 %. El cultivo celular se llevó a cabo en estas condiciones durante 7 días. Después de este tiempo, los monocitos se transformaron en macrófagos y se añadieron los compuestos de prueba: urolitina A, urolitina B, iso-urolitina A y sus glucurónidos correspondientes a una concentración de 40 μ M y LPS de *Escherichia coli* (100 ng/ml). Después de 24 h, se determinó el nivel de TNF-alfa en el medio mediante el método inmunoquímico de ELISA (BD biosciences).

Resultados:

5 Estudios en macrófagos aislados de sangre periférica humana han confirmado que el compuesto más activo en la inhibición de la producción de TNF-alfa es la urolitina A. Al igual que en los estudios en la línea celular THP-1, la urolitina B fue inactiva y el isómero de la urolitina A, iso-urolitina A, fue significativamente menos activo.

10 Basándose en los resultados anteriores, se encontró que el factor que condiciona la inhibición de la respuesta inflamatoria es la presencia de dos grupos fenol ubicados en posiciones estrictamente definidas 3 y 8 de la molécula de urolitina A. Estos grupos pueden estar esterificados con residuos de acetilo, lo que puede conducir a un aumento de la actividad antiinflamatoria, mientras que la unión de residuos de ácido glucurónico u otros grupos acilo provoca la pérdida de la actividad antiinflamatoria.

15 Los resultados obtenidos de los experimentos en modelos *in vitro* se analizaron usando el programa Statistica 13 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EE. UU.) y se presentaron como valores medios \pm EEM. La significación estadística se estableció en $P \leq 0,05$. Los resultados con distribución normal establecida en la prueba de D'Agostin y Pearson se prepararon usando análisis de varianza (ANOVA). El análisis a posteriori paramétrico se realizó usando la prueba de Dunnett.

20 *Efecto de la terapia local usando urolitina A sobre los cambios inflamatorios provocados por enfermedades inflamatorias de la piel, en particular la dermatitis atópica y la psoriasis.*

25 La composición terapéutica fue un ungüento preparado a base de vaselina blanca con urolitina A al 1,0 % añadida. El ungüento de control fue vaselina blanca sin la adición de urolitina A. La composición de urolitina A al 1,0 % y el portador, vaselina blanca, se aplicaron sobre la piel lavada y secada por los propios voluntarios, a una dosis de 20 mg de ungüento por superficie de 4 cm² diariamente, una vez al día durante dos semanas.

30 En el estudio se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: sensación de molestia después de la aplicación de la composición sobre la piel, facilidad de aplicación, decoloración de la piel en el lugar de aplicación, enrojecimiento de la piel en el lugar de aplicación de la composición, grado de sequedad de la zona tratada de la piel, sensación de pinchazos, ardor, picor y otros tipos de molestias. Los participantes en el estudio determinaron su nivel de satisfacción/insatisfacción en una escala de 10 puntos, siendo 0 insatisfacción y 10 satisfacción, con la composición farmacéutica para su uso según la presente invención. Se ha demostrado que el uso de una composición que contiene urolitina A no provocó ningún efecto adverso, a diferencia de las reacciones adversas tras el uso de hidrocortisona.

35 *Estabilidad térmica de la urolitina A en agua y en ambiente ácido.*

40 La urolitina A a 80 μ M se suspendió en agua desionizada o HCl 1 M y se incubó durante 24 horas a 37 °C o durante 12 horas a 80 °C. La disolución de urolitina A también se irradió durante 12 horas con una lámpara UV que emitía radiación UVA con un máximo de 365 nm. La concentración de urolitina A después de la incubación se determinó usando el método de UPLC-DAD-MS según Piwowarski *et al.* 2016.

Resultados:

45 La urolitina A fue estable en las condiciones estudiadas, no se observó degradación de la urolitina A ni ningún cambio en la estructura química del compuesto.

50 Dado que los preparados de piel contienen grandes cantidades de agua y el pH de la piel es de 5,5, la estabilidad de la urolitina A en el entorno acuoso y a un pH bajo es especialmente importante para el desarrollo de preparados de piel que la contienen. La estabilidad bajo la influencia de la radiación UV es importante durante el almacenamiento del preparado y la exposición al sol del preparado aplicado sobre la piel.

Bibliografía no de patentes:

55 D'Amico, F., Granata, M., Skarmoutsou, E., Trovato, C., Lovero, G., Gangemi, P., Longo, V., Pettinato, M., Mazzarino, M.C., 2018. Biological therapy downregulates the heterodimer S100A8/A9 (calprotectin) expression in psoriatic patients. *Inflamm Res* 67, 609-616.

60 Furue, K., Ito, T., Tsuji, G., Kadono, T., Nakahara, T., Furue, M., 2018. Autoimmunity and autoimmune co-morbidities in psoriasis. *Immunology* 154, 21-27.

65 Liu, C.F., Li, X.L., Zhang, Z.L., Qiu, L., Ding, S.X., Xue, J.X., Zhao, G.P., Li, J., 2018. Anti-aging Effects Of Urolithin A On Replicative Senescent Human Skin Fibroblasts. *Rejuvenation Res* 22, 191-200.

Papier, A., Strowd, L.C., 2018. Atopic dermatitis: a review of topical nonsteroid therapy. *Drugs Context* 7, 212521.

- Tomas-Barberan, F.A., Selma, M.V., Espin, J.C., 2018. Polyphenols' Gut Microbiota Metabolites: Bioactives or Biomarkers? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 3593-3594.
- 5 Yadav, K., Singh, D., Singh, M.R., 2018. Protein biomarker for psoriasis: A systematic review on their role in the pathomechanism, diagnosis, potential targets and treatment of psoriasis. *Int J Biol Macromol* 118, 1796-1810.
- Pastore, S., Mascia, F., Mariotti, F., Dattilo, C., Mariani, V., Girolomoni, G., 2005. ERK1/2 Regulates Epidermal Chemokine Expression and Skin Inflammation. *J Immunol* 174, 5047-505.
- 10 Tomas-Barberan, F.A., Gonzalez-Sarrias, A., Garcia-Villalba, R., Nunez-Sanchez, M.A., Selma, M.V., Garcia-Conesa, M.T., Espin, J.C., 2017. Urolithins, the rescue of "old" metabolites to understand a "new" concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol Nutr Food Res* 61, 1500901.
- 15 Deng, Y., Chang, C., Lu, Q., 2016. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 50, 377-389.
- Eichenfield, L.F.M., Friedlander, S.F.M., Simpson, E.L.M.M., Irvine, A.D.M., 2016. Assessing the New and Emerging Treatments for Atopic Dermatitis. *Semin Cutan Med Surg* 35, S92-96.
- 20 Piowarski, J.P., Granica, S., Stefanska, J., Kiss, A.K., 2016. Differences in Metabolism of Ellagitannins by Human Gut Microbiota ex Vivo Cultures. *J Nat Prod* 79, 3022-3030.
- 25 Pruenster, M., Vogl, T., Roth, J., Sperandio, M., 2016. S100A8/A9: From basic science to clinical application. *Pharmacol Ther* 167,120-131.
- Weidinger, S., Novak, N., 2016. Atopic dermatitis. *Lancet* 387, 1109-1122.
- 30 D'Haens, G., Sandborn, W.J., Colombel, J.F., Rutgeerts, P., Brown, K., Barkay, H., Sakov, A., Haviv, A., Feagan, B.G., Laquinimod for Crohn's Disease, I., 2015. A phase II study of laquinimod in Crohn's disease. *Gut* 64, 1227-1235.
- Piowarski, J.P., Kiss, A.K., 2015. Contribution of C-glucosidic ellagitannins to *Lythrum salicaria* L. influence on pro-inflammatory functions of human neutrophils. *J Nat Med* 69, 100-110.
- 35 Piowarski, J.P., Kiss, A.K., Granica, S., Moeslinger, T., 2015. Urolithins, gut microbiota-derived metabolites of ellagitannins, inhibit LPS-induced inflammation in RAW 264.7 murine macrophages. *Mol Nutr Food Res* 59, 2168-2177.
- 40 Tuohy, K., Del Rio, D., 2015. Diet-Microbe Interactions in the Gut. Effects on Human Health and Disease. Elsevier.
- Jin, S., Park, C.O., Shin, J.U., Noh, J.Y., Lee, Y.S., Lee, N.R., Kim, H.R., Noh, S., Lee, Y., Lee, J.H., Lee, K.H., 2014. DAMP molecules S100A9 and S100A8 activated by IL-17A and house-dust mites are increased in atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 23, 938-941.
- 45 Piowarski, J.P., Granica, S., Kiss, A.K., 2014a. Influence of gut microbiota-derived ellagitannins' metabolites urolithins on pro-inflammatory activities of human neutrophils. *Planta Med* 80, 887-895.
- 50 Piowarski, J.P., Granica, S., Zwierzynska, M., Stefanska, J., Schopohl, P., Melzig, M.F., Kiss, A.K., 2014b. Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. *J Ethnopharmacol* 155, 801-809.
- Colombo, E., Sangiovanni, E., Dell'agli, M., 2013. A review on the anti-inflammatory activity of pomegranate in the gastrointestinal tract. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013, 247145.
- 55 D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., Scott, T., 2013. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci* 14, 12222-12248.
- Espin, J.C., Larrosa, M., Garcia-Conesa, M.T., Tomas-Barberan, F., 2013. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic Acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013, 270418.
- 60 Haiser, H.J., Turnbaugh, P.J., 2013. Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Pharmacological research* 69, 21-31.
- 65 Schonthaler, H.B., Guinea-Viniegra, J., Wculek, S.K., Ruppen, I., Ximenez-Embun, P., Guio-Carrion, A., Navarro, R.,

- Hogg, N., Ashman, K., Wagner, E.F., 2013. S100A8-S100A9 protein complex mediates psoriasis by regulating the expression of complement factor C3. *Immunity* 39, 1171-1181.
- 5 Bengtsson, A.A., Sturfelt, G., Lood, C., Ronnblom, L., van Vollenhoven, R.F., Axelsson, B., Sparre, B., Tuveesson, H., Ohman, M.W., Leanderson, T., 2012. Pharmacokinetics, tolerability, and preliminary efficacy of paquinimod (ABR-215757), a new quinoline-3-carboxamide derivative: studies in lupus-prone mice and a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, repeat-dose, dose-ranging study in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 64, 1579-1588.
- 10 Comi, G., Jeffery, D., Kappos, L., Montalban, X., Boyko, A., Rocca, M.A., Filippi, M., Group, A.S., 2012. Placebo-controlled trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 366, 1000-1009.
- Ishimoto, H., Shibata, M., Myojin, Y., Ito, H., Sugimoto, Y., Tai, A., Hatano, T., 2011. *In vivo* anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A. *Bioorg Med Chem Lett* 21, 5901-5904.
- 15 Larrosa, M., Garcia-Conesa, M.T., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A., 2010a. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular aspects of medicine* 31, 513-539.
- Larrosa, M., Gonzalez-Sarrias, A., Yanez-Gascon, M.J., Selma, M.V., Azorin-Ortuno, M., Toti, S., Tomas-Barberan, F., Dolara, P., Espin, J.C., 2010b. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nutr Biochem* 21, 717-725.
- 20 Bialonska, D., Kasimsetty, S.G., Khan, S.I., Ferreira, D., 2009. Urolithins, intestinal microbial metabolites of Pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *J Agric Food Chem* 57, 10181-10186.
- 25 Bjork, P., Bjork, A., Vogl, T., Stenstrom, M., Liberg, D., Olsson, A., Roth, J., Ivars, F., Leanderson, T., 2009. Identification of human S100A9 as a novel target for treatment of autoimmune disease via binding to quinoline-3-carboxamides. *PLoS Biol* 7, e97.
- 30 Odhiambo, J.A., Williams, H.C., Clayton, T.O., Robertson, C.F., Asher, M.I., Group, I.P.T.S., 2009. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *J Allergy Clin Immunol* 124, 1251-1258 e1223.
- 35 Breneman, D., Fleischer, A.B., Jr., Abramovits, W., Zeichner, J., Gold, M.H., Kirsner, R.S., Shull, T.F., Crowe, A.W., Jaracz, E., Hanifin, J.M., Tacrolimus Ointment Study, G., 2008. Intermittent therapy for flare prevention and long-term disease control in stabilized atopic dermatitis: a randomized comparison of 3-times-weekly applications of tacrolimus ointment versus vehicle. *J Am Acad Dermatol* 58, 990-999.
- 40 Berth-Jones, J., Damstra, R.J., Golsch, S., Livden, J.K., Van Hooteghem, O., Allegra, F., Parker, C.A., Multinational Study, G., 2003. Twice weekly fluticasone propionate added to emollient maintenance treatment to reduce risk of relapse in atopic dermatitis: randomised, double blind, parallel group study. *BMJ* 326, 1367.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende una o más sustancias auxiliares típicas y un principio activo, caracterizada porque como principio activo contiene urolitina A o 3,8-diacetato de urolitina A, preferiblemente urolitina A sintética, para su uso en el tratamiento, la inhibición y la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel y/o de las membranas mucosas,
y en donde la composición es para administración externa tópica.
- 10 2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho principio activo está presente en una cantidad de desde aproximadamente el 0,0001 por ciento en peso hasta aproximadamente el 15 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición, preferiblemente de desde aproximadamente el 0,01 por ciento en peso hasta aproximadamente el 5 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición, más preferiblemente de desde aproximadamente el 0,1 por ciento en peso hasta aproximadamente el 2 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición, lo más preferiblemente del 1 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición.
- 15 3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 ó 2, que contiene además al menos un fármaco seleccionado del grupo de esteroides, inhibidores de calcineurina, fármacos con actividad antibacteriana, antifúngica o antiviral, preferiblemente seleccionado del grupo de esteroides o inhibidores de calcineurina, más preferiblemente el fármaco es un inhibidor de calcineurina.
- 20 4. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 anteriores, en donde la urolitina A es el único principio activo presente en la composición.
- 25 5. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 anteriores, en donde dicha al menos una sustancia auxiliar farmacéuticamente aceptable se selecciona de un portador y/o un excipiente y/o un diluyente y combinaciones de los mismos.
- 30 6. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 anteriores, en donde dicha sustancia auxiliar farmacéuticamente aceptable es uno o más de agentes protectores, adsorbentes, demulcentes, emolientes, conservantes, antioxidantes, hidratantes, agentes de tamponamiento y agentes solubilizantes.
- 35 7. Composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 1-6, en donde la composición es para administración tópica externa al área enferma que está en el intervalo de desde aproximadamente 0,0001 g/cm² de área de superficie de la piel hasta aproximadamente 0,5 g/cm², preferiblemente desde 0,001 g/cm² hasta aproximadamente 0,2 g/cm² de área de superficie de la piel.
- 40 8. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha composición está en forma líquida, preferiblemente en forma de tónico, bálsamo, loción, espuma, más preferiblemente en forma de tónico.
- 45 9. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha composición está en forma semisólida, preferiblemente en forma de ungüento, crema, pasta, gel, preferiblemente en forma de ungüento o crema, más preferiblemente en forma de ungüento.
- 50 10. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8 ó 9, en donde dicha composición está destinada a aplicarse en el área enferma de manera manual, preferiblemente usando un gotero, una varilla de aplicación o un aplicador en aerosol.
- 55 11. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha composición está en forma de un sistema terapéutico transdérmico, tal como un parche intradérmico o un parche transdérmico.
- 60 12. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 anteriores, en donde la enfermedad inflamatoria de la piel y/o de las membranas mucosas se selecciona del grupo que consiste en inflamaciones de la piel, vasculitis, lupus eritematoso, dermatomiositis, esclerodermia, esclerosis múltiple, arteritis de células gigantes, psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis seborreica, dermatitis de contacto, urticaria, rosácea, dermatitis herpetiforme, liquen plano, hidradenitis supurativa, pitiriasis rosada de Gibert, hidrocistoma, aftas, dermatitis del pañal, acné adolescente, eczema de contacto no alérgico, paniculitis, celulitis.
- 65 13. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en donde dicha enfermedad de la piel y/o de las membranas mucosas es psoriasis.

14. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en donde dicha enfermedad de la piel y/o de las membranas mucosas es dermatitis atópica.

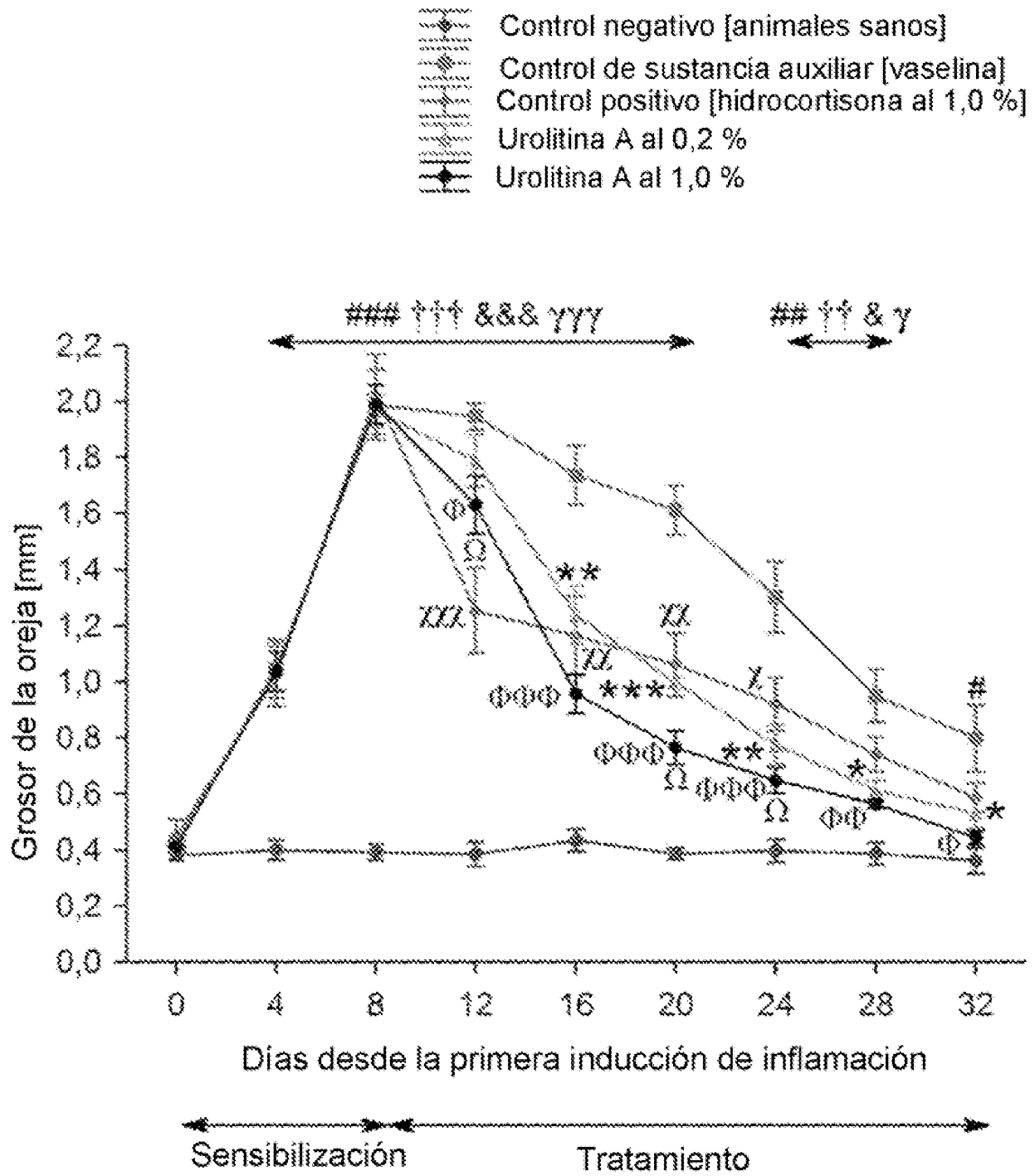


FIG. 1

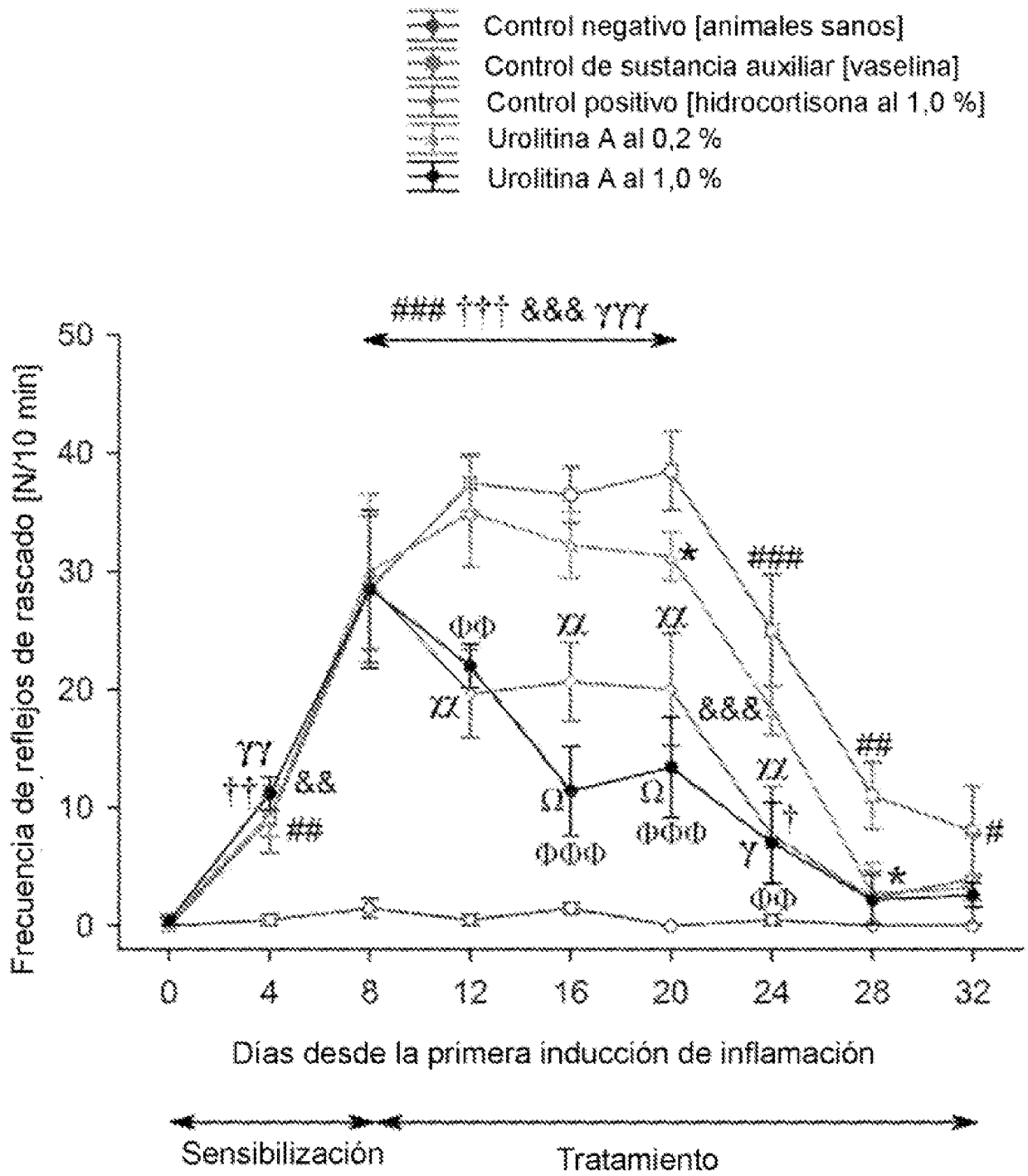


FIG. 2

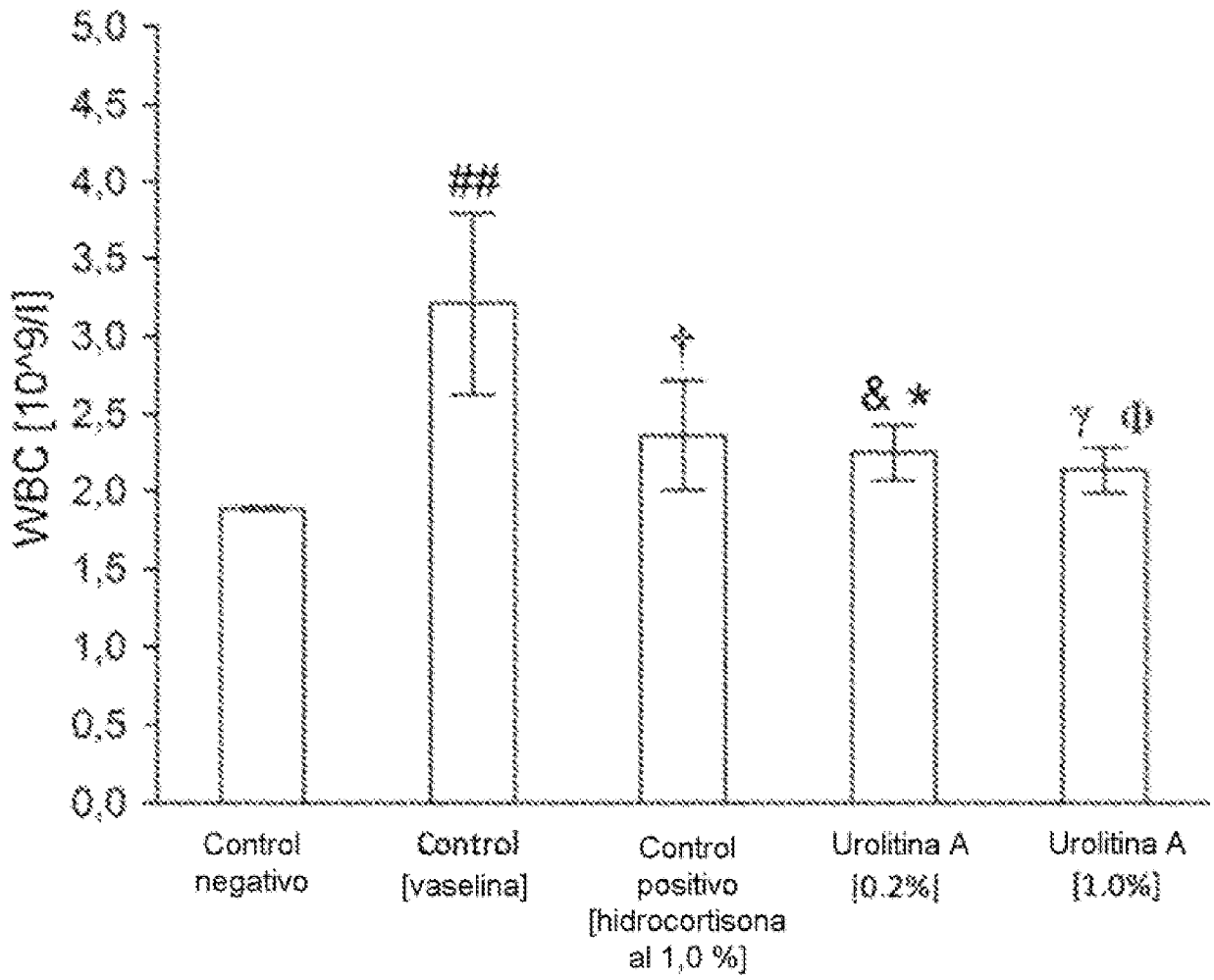


FIG. 3

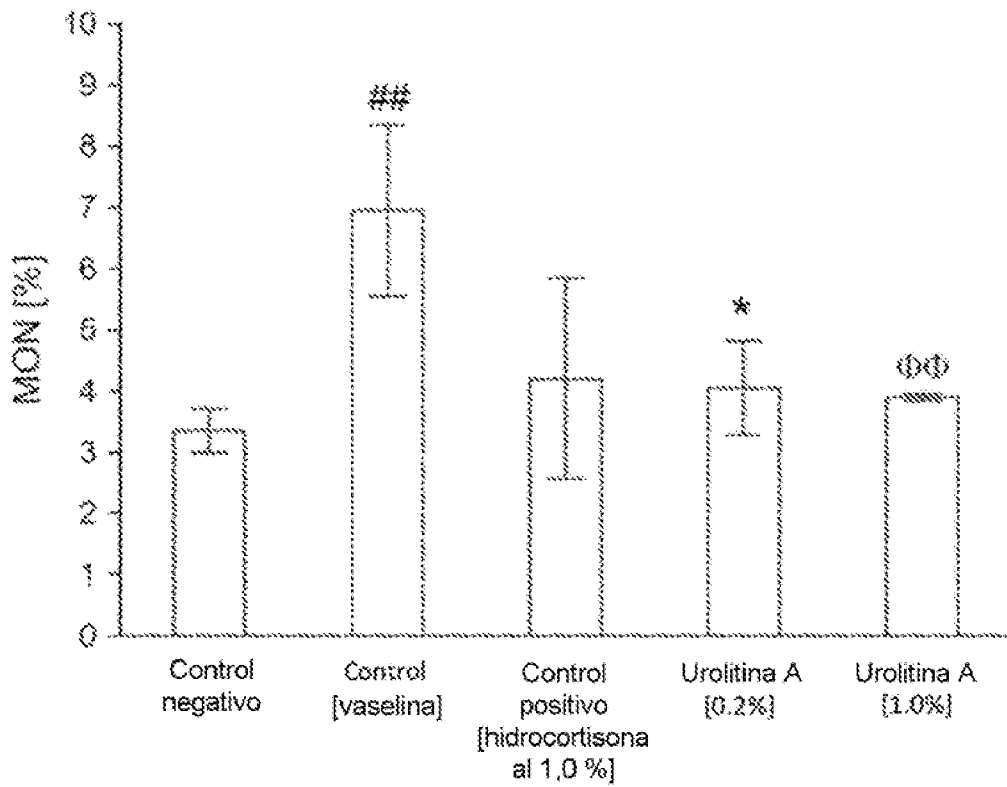
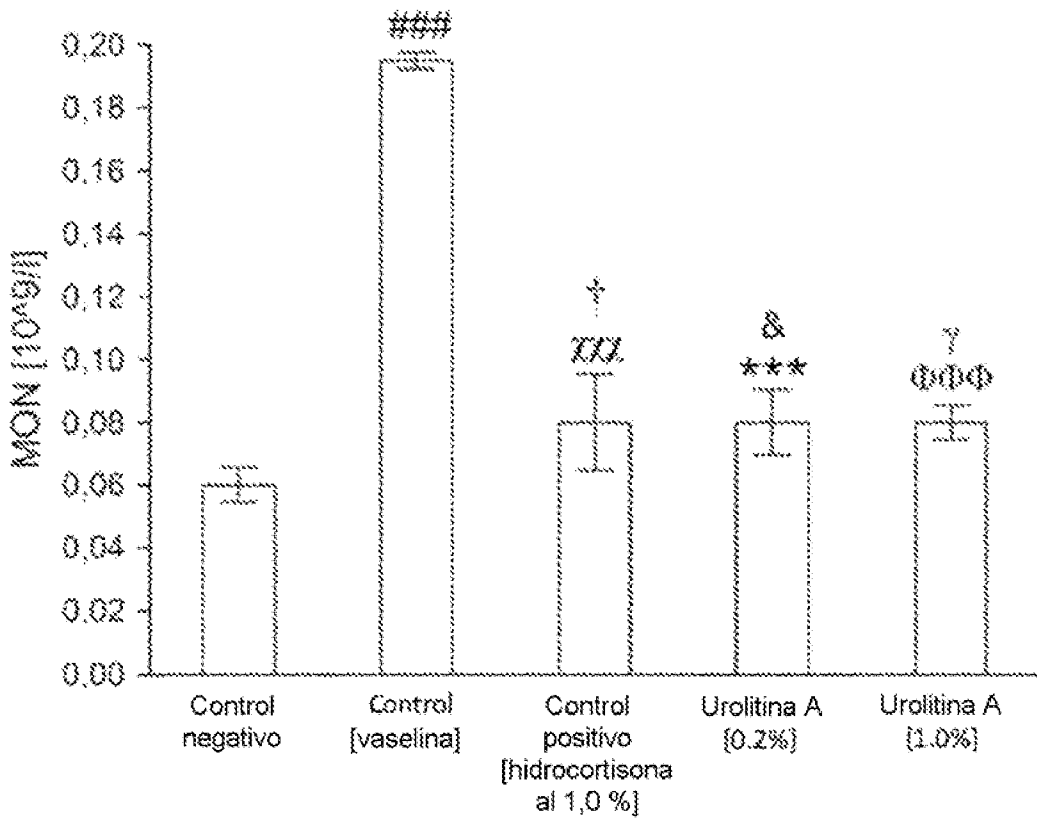


FIG. 4

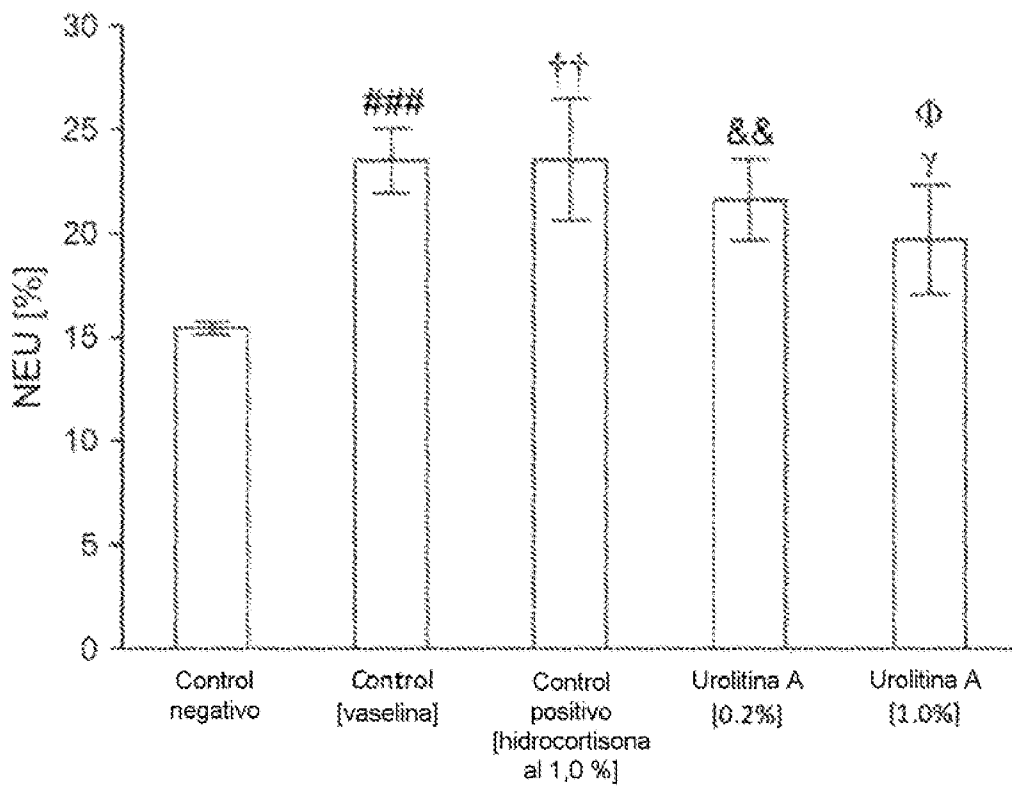
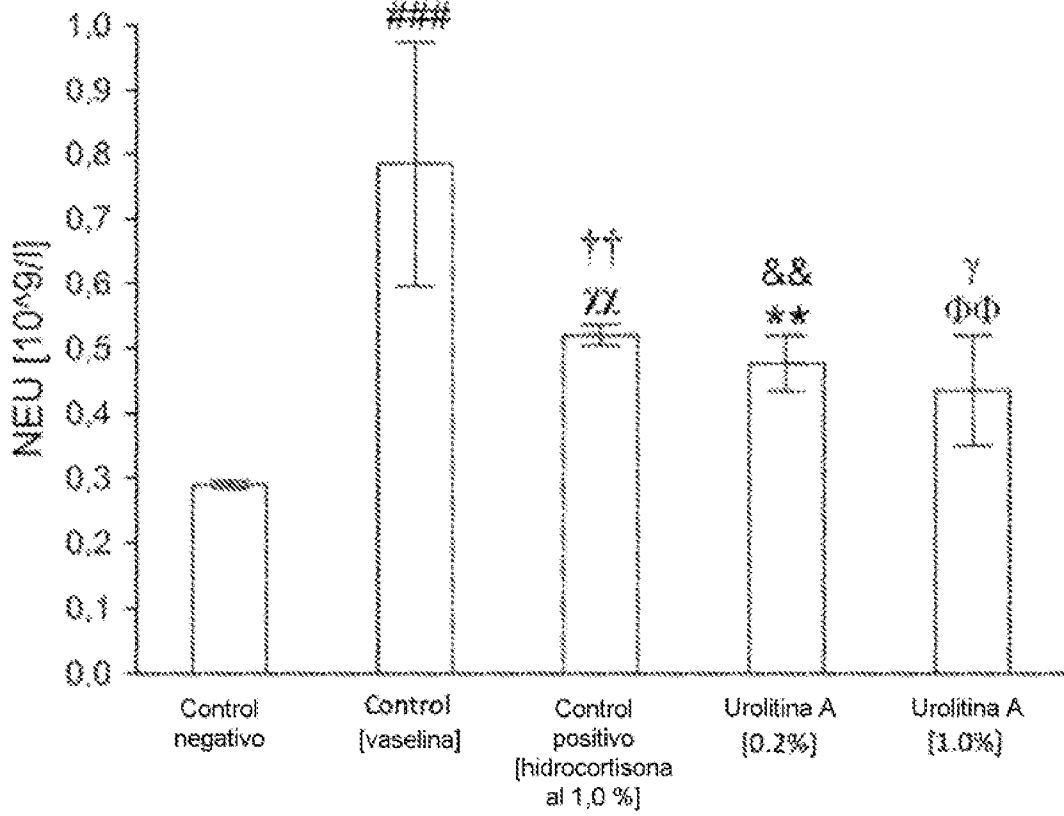


FIG. 5

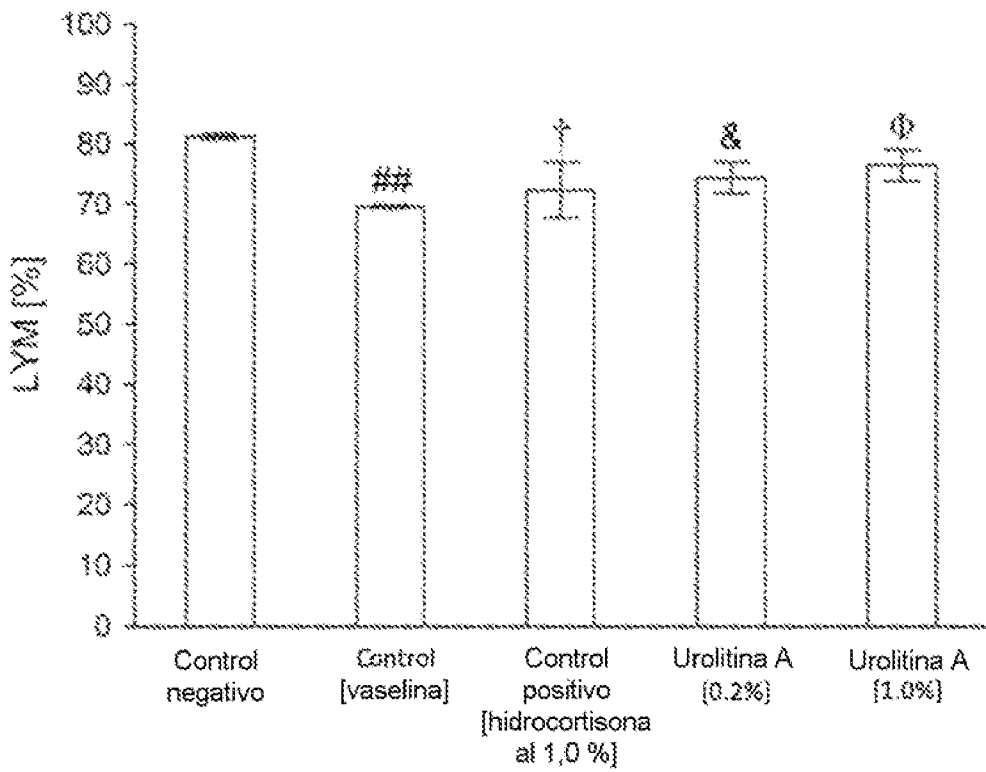
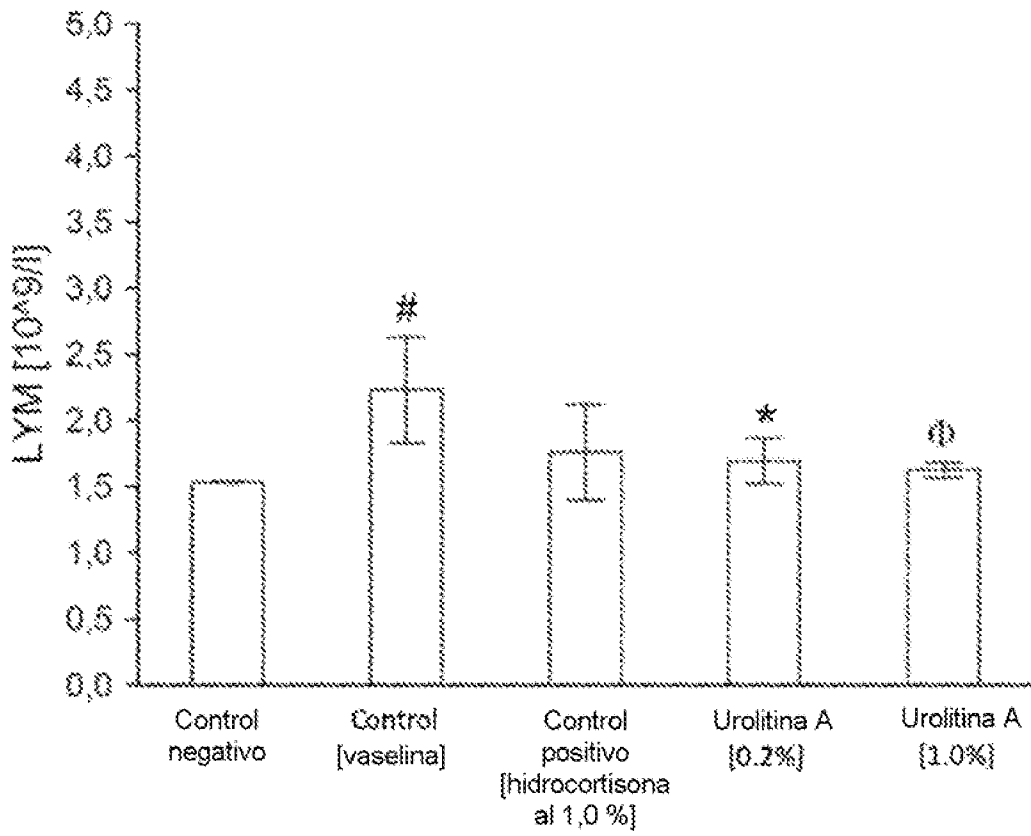


FIG. 6

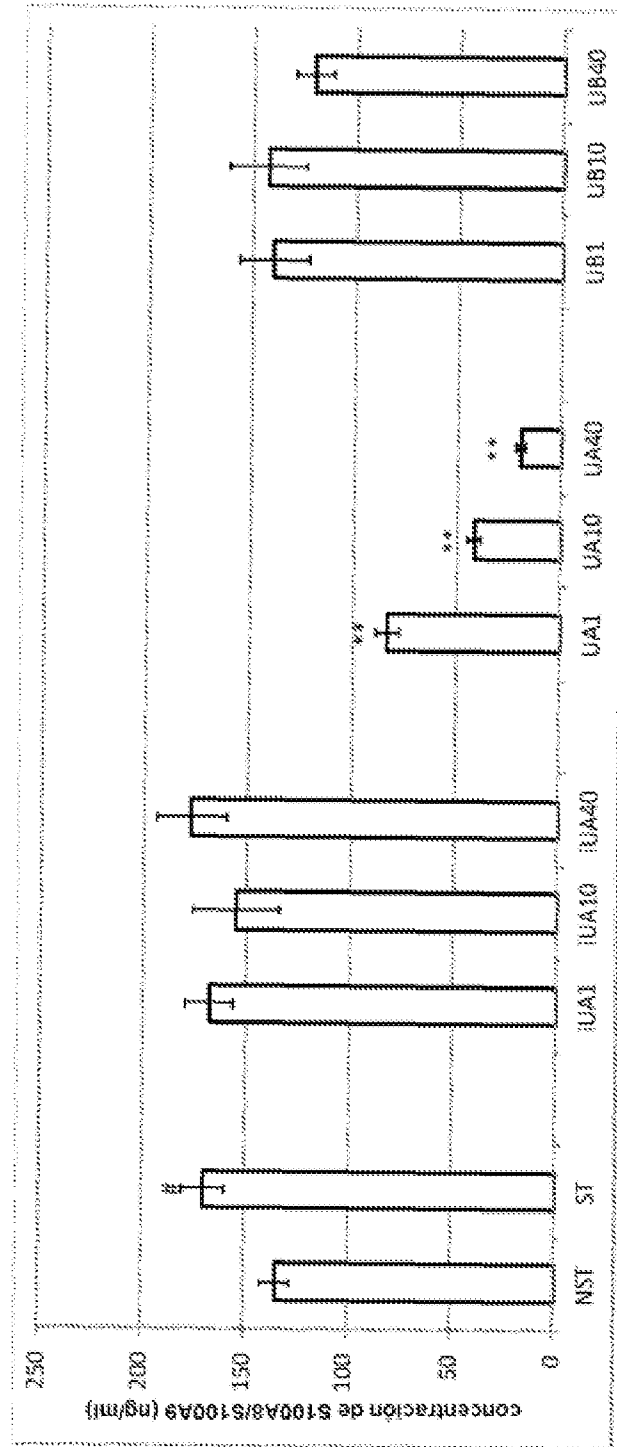


FIG. 7

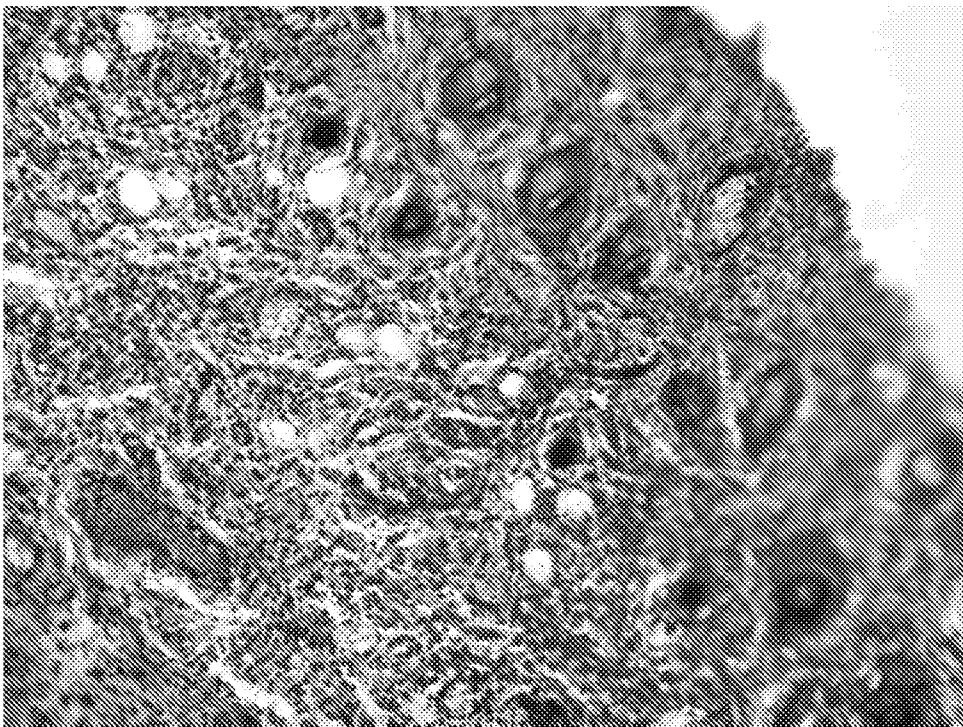
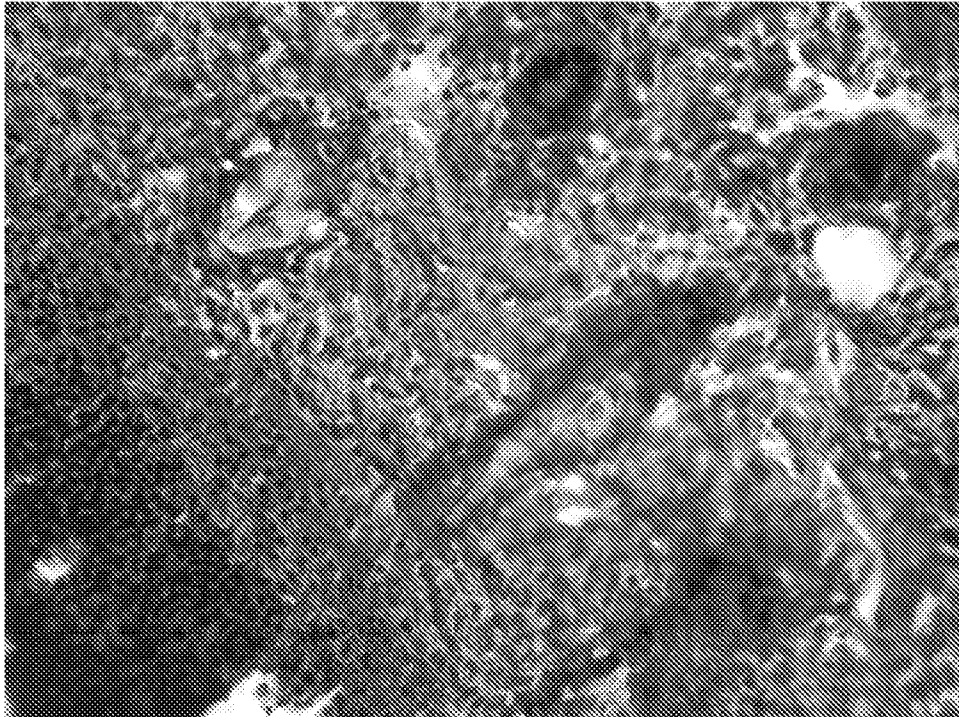


FIG. 8

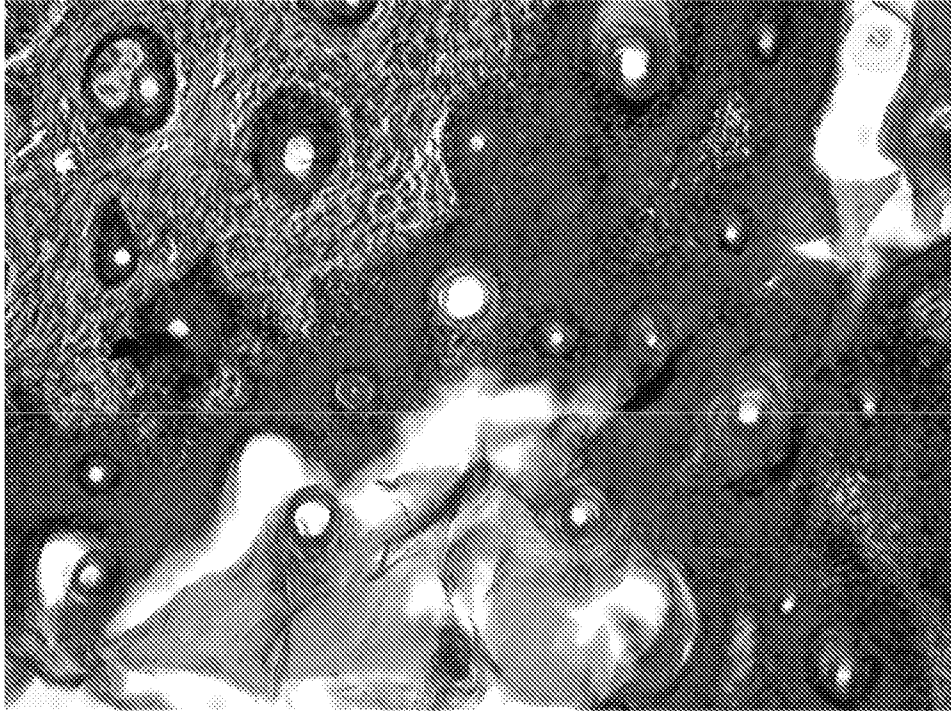


FIG. 9

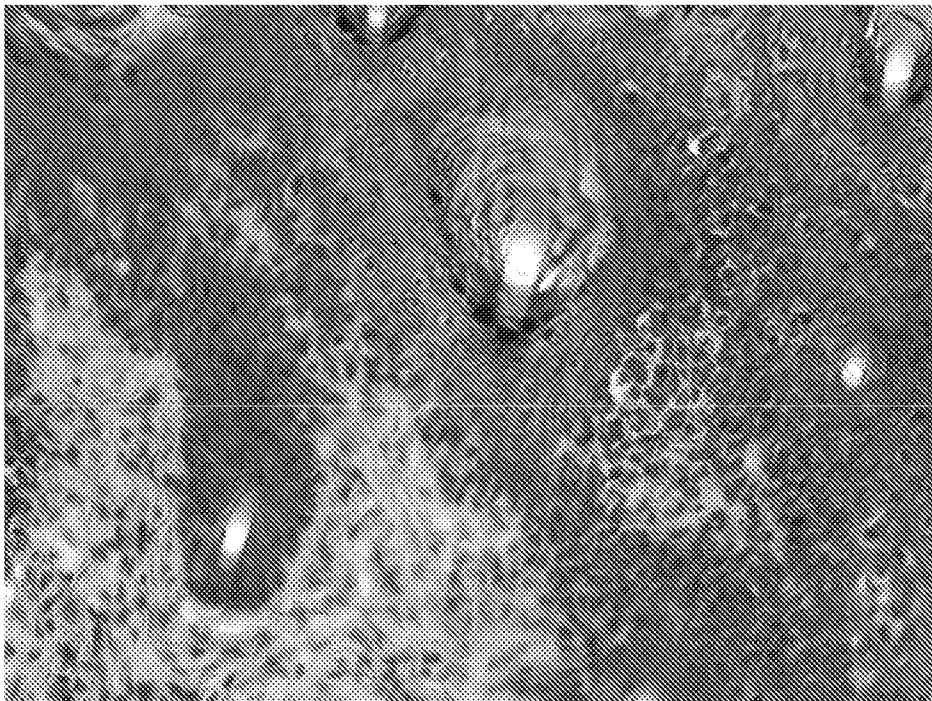


FIG. 10

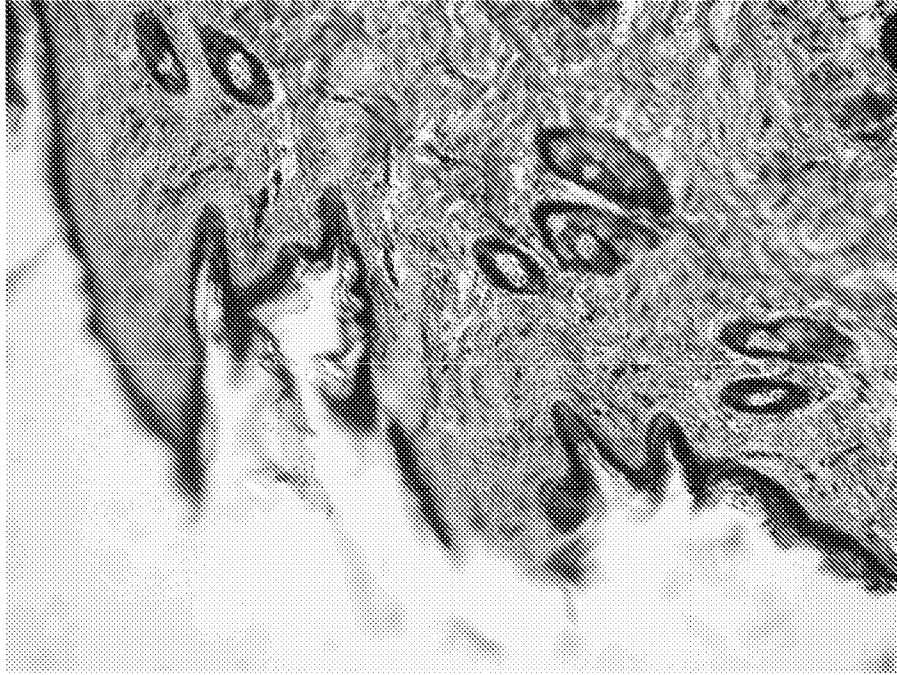


FIG. 11

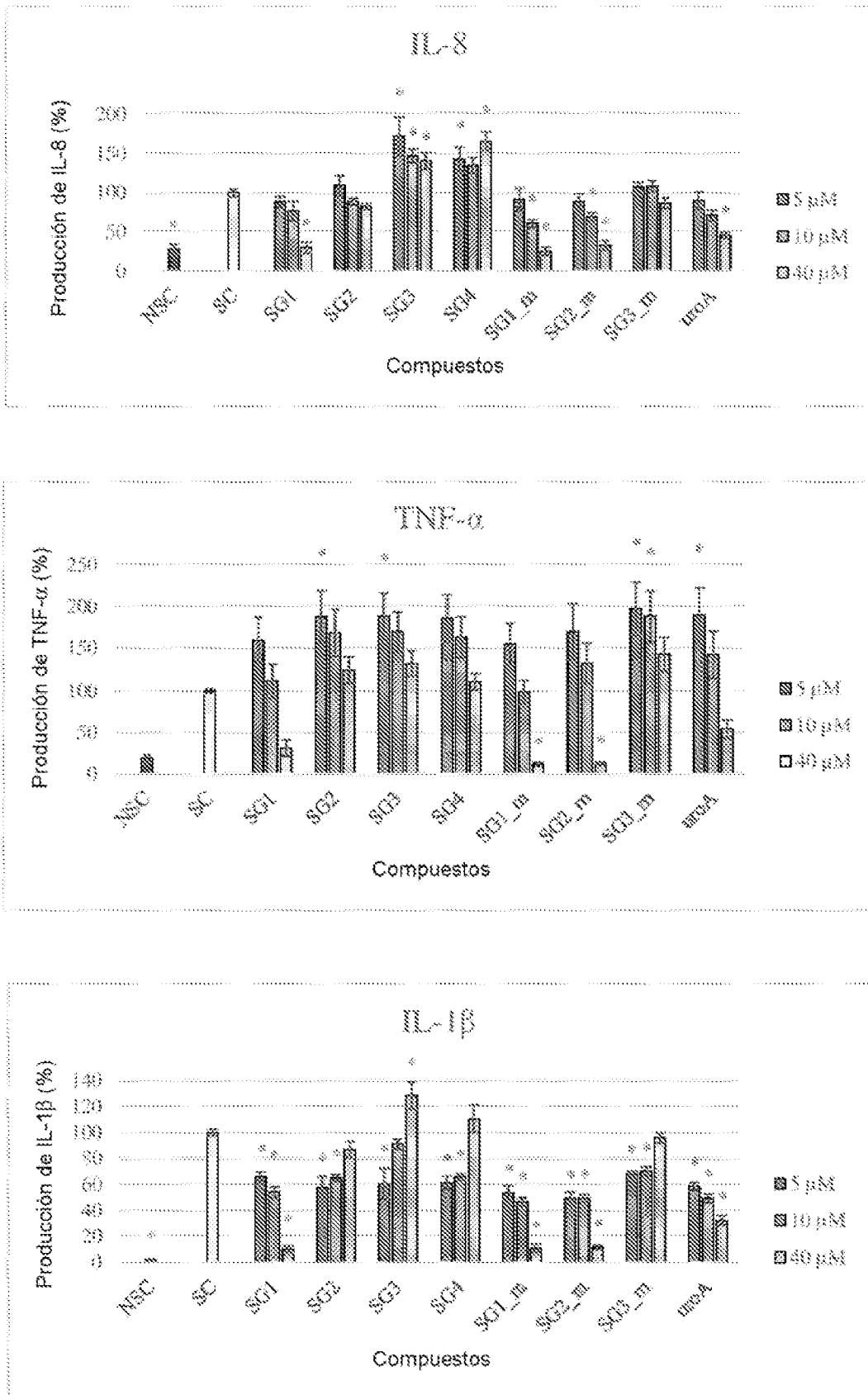


FIG. 12

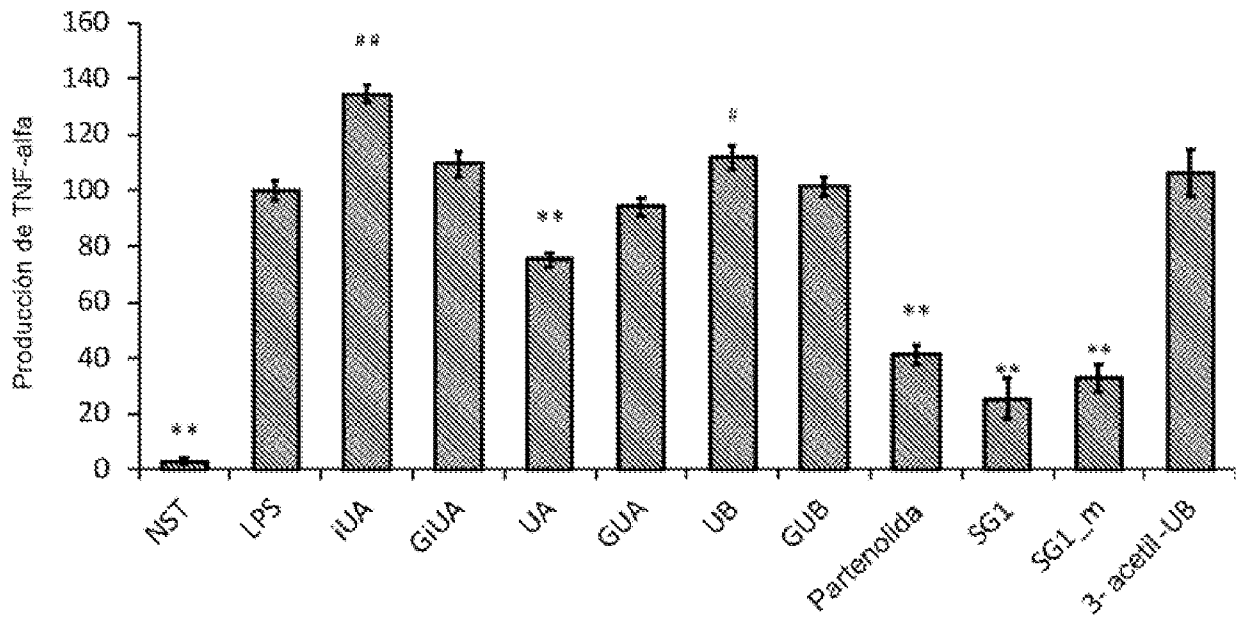


FIG. 13

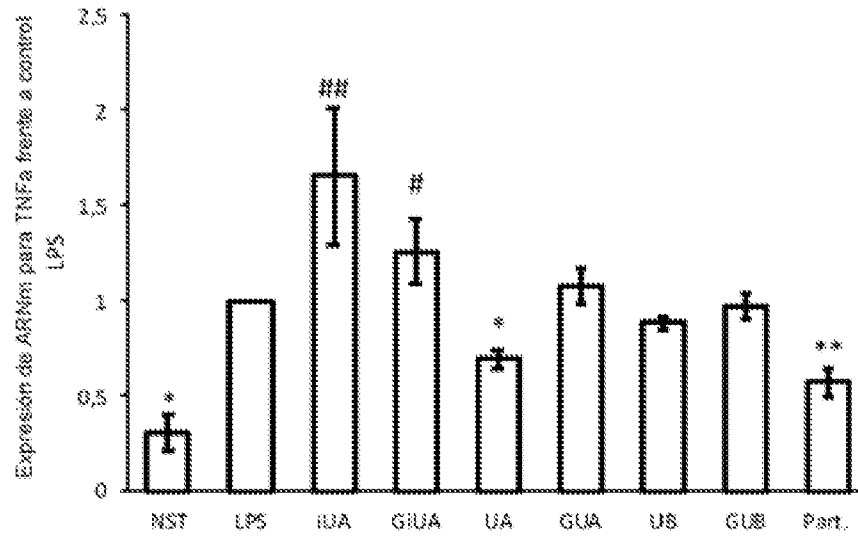


FIG. 14

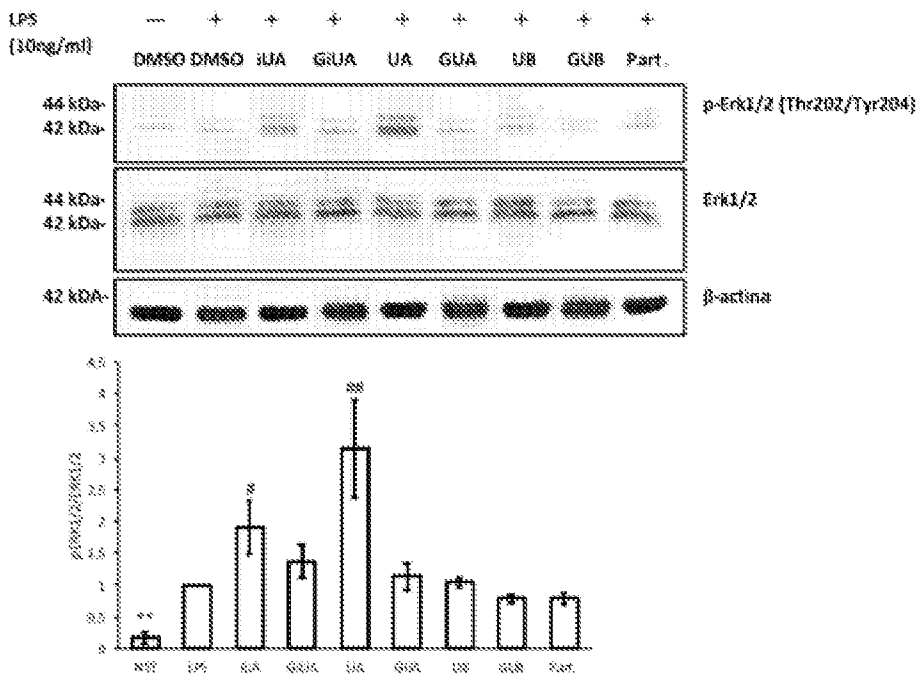


FIG. 15

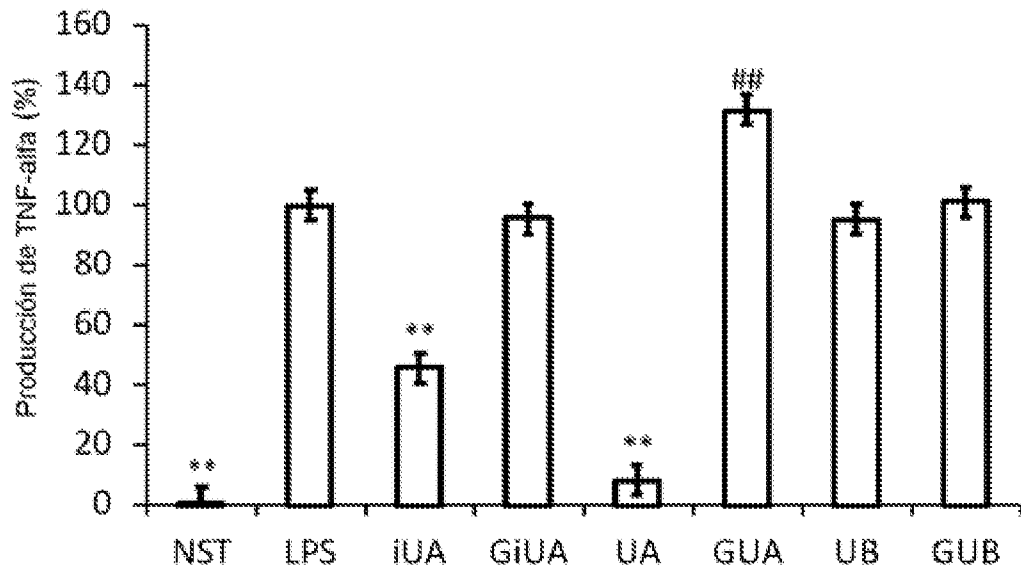


FIG. 16

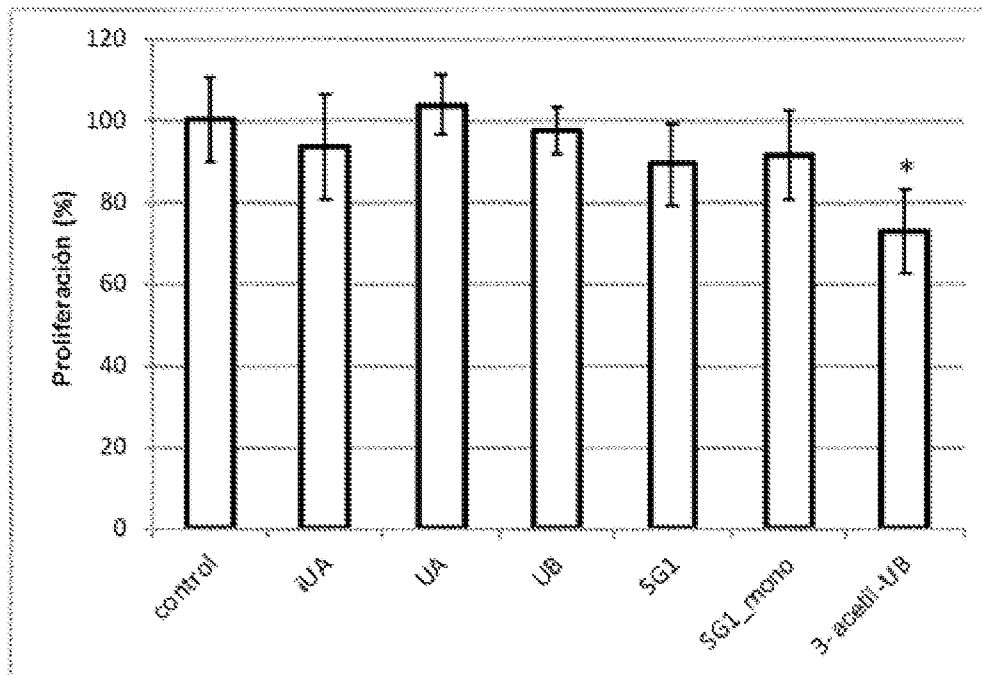


FIG. 17

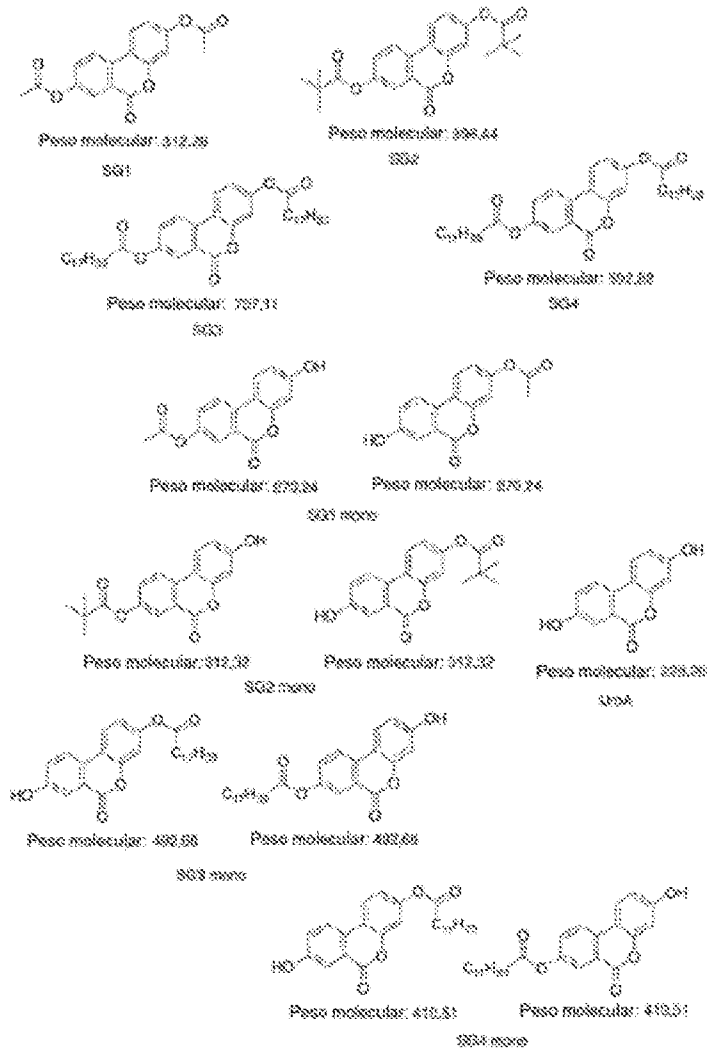


FIG. 18

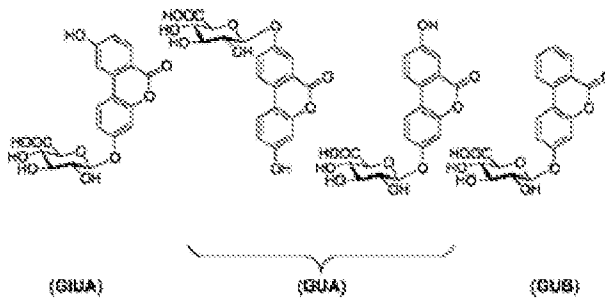


FIG. 19