

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 909**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4375 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 17/08 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2010 PCT/CN2010/000983**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11000218**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2010 E 10793513 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2448577**

54 Título: **Composiciones que contienen berberina o análogos de la misma para tratar rosácea o trastornos de la piel relacionados con enrojecimiento de la cara**

30 Prioridad:

30.06.2009 US 221725 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2017

73 Titular/es:

**DERMAN BIOMEDICINE CO. LTD. (100.0%)
No. 12, Wen 23 Street, Dahu village; Guishan
Township
Taoyuan County 33380, TW**

72 Inventor/es:

**HUNG, SHUEN-LU;
CHUNG, WEN-HUNG y
CHANG, TSE-WEN**

74 Agente/Representante:

CAMPello ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 600 909 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que contienen berberina o análogos de la misma para tratar rosácea o trastornos de la piel relacionados con enrojecimiento de la cara.

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

1. Rosácea y sus síntomas principales

10 La rosácea es una enfermedad crónica de la piel que manifiesta enrojecimiento e hinchazón, principalmente en la cara, especialmente en el área facial central. Otras áreas afectadas incluyen el cuero cabelludo, cuello, oídos, pecho, espalda y los ojos. La rosácea se caracteriza por enrojecimiento facial, eritema, telangiectasia, y episodios inflamatorios con pápulas y pústulas y, en casos graves, rinofima. Los comedones están notablemente ausentes¹.

15

Los pacientes con rosácea tienen principalmente sensibilidad aumentada de la piel facial y dermatitis facial exfoliante seca, edema de la cara, y papulonódulos granulomatosos persistentes². De acuerdo con los rasgos clínicos e histopatológicos, la enfermedad se puede clasificar en 4 subtipos: (a) eritematotelangiectásica, (b) papulopustular, (c) fimatosa, y (d) ocular, cada una con tres grados de gravedad (ligero, moderado, grave)³. El transcurso de la enfermedad típicamente es crónico, con remisiones y relapsos recurrentes.

20

2. Otros trastornos de la piel relacionados con enrojecimiento de la cara

25 La rosácea es el trastorno de la piel de enrojecimiento de la cara más común. Otros trastornos de la piel relacionados con enrojecimiento de la cara, los cuales comparten similitudes sintomáticas y probablemente causas patológicas, incluyen acné común, dermatitis seborréica, fotodermatitis y dermatitis por contacto. Estas afecciones relacionadas con el enrojecimiento de la cara pueden variar desde sensaciones de calor y sensibilidad al enrojecimiento o calor excesivo con sensibilidad intensa⁴.

30

Los pacientes con rosácea y otros trastornos de la piel relacionados con el enrojecimiento de la cara con frecuencia muestran sensibilidad extrema a factores ambientales y tópicos⁵. La dermatitis tipo rosácea inducida por esteroides (o rosácea por esteroides) es una lesión papular o pustular con base eritematosa y edematosa con o sin telangiectasia, la cual es ocasionada por la aplicación prolongada de esteroides tópicos a la cara o como una afección de rebote después de discontinuar la aplicación de esteroides tópicos^{6,7} (Chen AY Zirwas MJ, 2009; Lee DH, Li K, Suh DH 2008). Los inhibidores de EGFR, tales como cetuximab, erlotinib, gefitinib, causan dermatitis acneiforme en la cara u otra área de la piel, incluyendo reacción papulopustular, eritema, telangiectasias, y enrojecimiento en 30 al 90 % de los pacientes, y puede también súperinfectados con bacterias, tales como *Staphylococcus aureus*^{6,9} (Wollenberg A, Kroth J y col., 2010; Lacouture ME, Maitland ML y col., 2010).

35

3. Patogénesis de la rosácea

La etiología de rosácea no se entiende bien. Se ha sugerido que diversos factores contribuyen al desarrollo y manifestación de la rosácea. Sin embargo, ninguno de ellos se ha confirmado definitivamente¹.

40

3.1. Contribución genética

Estudios iniciales han indicado una predisposición genética al enrojecimiento, la manifestación más temprana de rosácea facial¹⁰. Adicionalmente, se ha indicado que el genotipo nulo de glutatión S-transferasa MU-1 (GSTM1) y glutatión S-transferasa theta 1 (GSTT1) está asociado a un aumento del riesgo de rosácea¹¹.

50

3.2. Inflamación y sistema inmune innato

A medida que la rosácea avanza, las lesiones inflamatorias se hacen evidentes. A diferencia del acné común, la rosácea inflamatoria no es una enfermedad bacteriana de la unidad pilosebácea. Los comedones normalmente no están presentes, y solamente se identifica flora bacteriana normal en 5 muestras de piel tomadas de pacientes con rosácea¹². La etapa inflamatoria de rosácea puede ser considerada como una forma de celulitis estéril crónica¹³. Aunque la presencia de microorganismos se ha examinado como un factor contribuyente potencial para la rosácea, los resultados no han sido concluyentes¹. Los ácaros *Demodex folliculorum* se consideran como comensales y no desempeñan un papel patógeno significativo en la rosácea, aunque una reacción inflamatoria hacia los ácaros puede 10 agravar los síntomas¹⁴.

Yamasaki y col. descubrieron un nivel anormalmente alto de catelicidinas mediante tinción histopatológica en lesiones de piel de pacientes con rosácea. Se descubrió que los queratinocitos epidérmicos humanos estimulados por péptidos de catelicidina aumentan la liberación de IL-8. La 15 inyección de péptidos de catelicidina en la piel de ratones causó cambios inflamatorios con aumento de la infiltración de neutrófilos y microvasos característicos del trastorno dérmico rosácea en seres humanos¹⁵. Las catelicidinas posiblemente desempeñan dobles funciones en la inmunidad debido a que pueden tanto aniquilar a los microorganismos como estimular las respuestas inflamatorias del huésped, tal como inducir la liberación de IL-8¹⁶. Se descubrió que otras citocinas inflamatorias que aumentan en 20 la rosácea incluyen IL-1 alfa y el factor de crecimiento transformante beta-2^{17,18}.

3.3. Mediadores vasculares

Los mediadores inflamatorios pueden ser responsables de la vasodilatación observada en pacientes con 25 rosácea. Por ejemplo, se han sugerido la sustancia P, histamina, serotonina, bradiquinina o prostaglandinas¹⁹. Smith y col. han notificado una expresión aumentada del factor de crecimiento endotelial vascular y sus receptores en la rosácea²⁰.

4. Gestión actual de la rosácea

30 Se han usado varios antibióticos, tales como tetraciclina y doxiciclina en el tratamiento de rosácea. Se ha sugerido que dichos antibióticos producen efectos antiinflamatorios en lugar de antimicrobianos. Sin embargo, otros agentes antiinflamatorios no son eficaces para tratar la rosácea. Los agentes inmunosupresores, tales como los corticosteroides, con frecuencia empeoran la afección inflamatoria de 35 la rosácea¹.

El metronidazol tópico y ciertos antibióticos sistémicos se usan con frecuencia como terapia de primera línea para la rosácea. La tetraciclina, doxiciclina, y minociclina orales se utilizan comúnmente para tratar la rosácea. La eficacia de los antibióticos orales probablemente se debe más a los efectos 40 antiinflamatorios que a los efectos antibióticos²¹. El ácido azelaico en gel al 15 % fue aprobado por la FDA de Estados Unidos en 2002 para el tratamiento tópico de rosácea ligera a moderada²². Otros agentes tópicos tradicionales que han sido utilizados en modo de "uso sin aprobación" incluyen clindamicina, sulfacetamida y azufre, pero su mecanismo no se entiende bien.

45 5. Uso de berberina en trastornos no dérmicos

La berberina (Amarillo Natural 18, 6-dihidro-9,10-dimetoxibenzo(g)-1,3-benzodioxolo (5,6-a)quinolizinio) es un alcaloide de isoquinolina presente en plantas herbáceas, tales como coptis (*Coptidis rhizome*), phellodendron, *Scutellaria baicalensis*, *Mahonia aquifolium* y agracejo²³. Se ha descubierto que la 50 berberina y sus derivados tienen actividades antimicrobianas y antimalaria. Puede actuar contra varios tipos de patógenos, tales como hongos, sacaromicetos, parásitos, bacterias y virus²⁴. Se ha descubierto que la berberina tiene otros beneficios potenciales. Por ejemplo, puede tener el potencial de tratar el colesterol alto en sangre, enfermedad cardiovascular, diabetes y tumor²⁵.

La berberina también tiene función antiinflamatoria, aunque el mecanismo exacto se desconoce. Recientemente, algún investigador indicó que el mecanismo antiinflamatorio de la berberina es mediado a través de la ruta de la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), debido a que COX-2 juega un papel clave en la síntesis de prostaglandinas, que se eleva en la inflamación²⁶. La berberina se usa como un ingrediente en algunas soluciones de gotas oftálmicas o pomadas oftálmicas para el tratamiento de tracoma²⁷.

6. Uso de berberina en trastornos de la piel

La patente de Estados Unidos n.º 6440465 pertenece a formulaciones dérmicas tópicas de glucosamina en una base emoliente que contiene berberina para el tratamiento de psoriasis²⁸. La solicitud de patente n.º 20050158404 pertenece a un producto nutricional, complemento dietético o composición farmacéutica que contiene vitamina A, vitamina E, selenio, vitamina B6, cinc, cromo y una fuente herbaria de berberina para el tratamiento de acné en administración oral²⁹. La patente de Estados Unidos n.º 6974799 se refiere a composiciones tópicas que comprenden un tripéptido (N-palmitoil-Gly-His-Lys) y un tetrapéptido (N-palmitoil-Gly-Gln-Pro-Arg) para el tratamiento de signos visibles del envejecimiento incluyendo arrugas, estrías, círculos oscuros³⁰. La formulación puede contener ingredientes adicionales, incluyendo berberina. En estas invenciones, la berberina está incluida como uno de los muchos ingredientes y no se especifica su concentración.

La solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20040146539 se refiere a composiciones nutraceuticas tópicas con beneficios anti-envejecimiento de adelgazamiento corporal y reafirmación del tono que se pueden utilizar para tratar envejecimiento de la piel, arrugas en la piel, exfoliación de la piel, acné, rosácea y otros problemas de la piel³¹. La composición de esta invención incluye agentes antimicrobianos seleccionados entre varios agentes, incluyendo berberina. En estas composiciones nutraceuticas, la berberina se incluye como uno de los muchos ingredientes y no se especifica su concentración. Ha existido una crema de *Mahonia aquifolium* al 10 % (Relieva™, Apollo Pharmaceutical Canada Inc) que contiene 0,1 % de berberina para tratamiento de la psoriasis³². La solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0286054 describe el tratamiento de trastornos de la piel y desvela composiciones que comprenden psorberina, que es un extracto no definido de la planta *Mahonia aquifolium*³⁹.

Se desconoce el efecto terapéutico de la berberina en el tratamiento de la rosácea y otro trastorno de la piel relacionado con el enrojecimiento de la cara. Hasta ahora, no hay evidencia directa que sugiera que la berberina puede mejorar los síntomas de la rosácea.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Existe la necesidad de una terapia eficaz para el tratamiento de rosácea y otros trastornos de la piel relacionados con efectos secundarios mínimos. La presente invención pertenece a formulaciones farmacéuticas tópicas que son eficaces y seguras en el tratamiento de rosácea y otros trastornos de la piel relacionados con enrojecimiento de la cara, seleccionados entre el grupo que consiste en dermatitis seborréica, dermatitis por contacto, fotodermatitis, dermatitis tipo rosácea inducida por esteroides, y dermatitis acneiforme inducida por inhibidores de EGFR. En particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica tópica para su uso en el tratamiento de trastornos de la piel relacionados con el enrojecimiento de la cara, que comprende al menos el 0,02 % p/p de berberina o un análogo biológicamente equivalente de berberina, en la que el análogo biológicamente equivalente de berberina se selecciona entre el grupo que consiste en jatrorrhizina, palmatina, coptisina, 9-demetilberberina, 9-demetilpalmatina, 13-hidroiberberina, berberrubina, palmatrubina, 9-O-etilberberrubina, 9-O-etil-13-etilberberrubina, sal 13-metildihidroberberina N-metilo, tetrahiproberberina y sales N-metilo de los mismos, y cloruro de 9-lauroilberberrubina, en la que la berberina o el análogo biológicamente equivalente de berberina es el único componente farmacéuticamente activo, y donde el trastorno de la piel relacionado con el enrojecimiento de la cara se selecciona entre el grupo que consiste en rosácea, dermatitis seborreica, fotodermatitis, dermatitis por contacto, dermatitis tipo rosácea inducida por esteroides, y dermatitis acneiforme inducida por inhibidores de EGFR. Preferiblemente, el trastorno de

la piel relacionado con el enrojecimiento de la cara es rosácea. En diversas realizaciones, la concentración de berberina, o el análogo biológicamente equivalente de berberina, está entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 2 % p/p.

- 5 La invención reconoce la deficiencia en las formulaciones farmacéuticas tópicamente actualmente disponibles o formulaciones experimentadas que contienen berberina como un componente, y mejora con respecto a esta deficiencia.

Existen líneas de evidencia que indican que la berberina es un principio farmacológico activo en estudios en animales y pruebas clínicas de berberina en seres humanos, ya sea con berberina purificada o con formulaciones que contienen extracto herbario de berberina. En muchas indicaciones patológicas, tal como en el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas y enfermedades cardiovasculares, a menudo se han obtenido resultados de eficacia estadísticamente significativos de berberina. En los ensayos sobre psoriasis con formulaciones que contienen extracto rico en berberina, también se obtuvieron resultados eficaces, aunque la eficacia de la berberina en psoriasis no se ha aceptado. Estos resultados sugieren que la berberina puede actuar sobre dianas moleculares y causar modificaciones en ciertas rutas moleculares y funciones celulares, tal como se ha descrito en la sección de antecedentes en esta solicitud de patente.

20 Se ha demostrado claramente en los estudios farmacológicos de numerosos compuestos farmacéuticos que un compuesto farmacéuticamente activo debe estar presente en el cuerpo o tejidos afectados por encima de ciertas concentraciones umbrales para que el fármaco logre efectos biológicos y farmacológicos significativos y, por lo tanto, efectos terapéuticos en el individuo tratado. En las preparaciones medicinales herbarias que contienen los extractos de una planta o de plantas múltiples, están presentes muchos ingredientes farmacológicos activos. En la mayoría de los tratamientos que utilizan preparaciones herbarias, en una vía de administración oral o tópica, los ingredientes farmacológicos individuales están presentes a concentraciones sub-umbrales en el cuerpo o tejidos afectados de un individuo tratado. Sin embargo, varios compuestos de la misma planta o de plantas diferentes pueden actuar sobre la misma diana molecular o varios compuestos procedentes de la misma planta o de plantas diferentes pueden actuar sobre dianas moleculares diferentes en la misma ruta biológica. Como resultado, los diversos compuestos actúan de forma concertada para ocasionar un efecto biológico y farmacológico significativo y, por lo tanto, efecto terapéutico.

35 Cuando una preparación farmacéutica herbaria no puede causar un efecto terapéutico en un sujeto tratado, es probable que un compuesto de alguna manera farmacológicamente activo contenido en la misma esté presente a una concentración muy baja en el sujeto tratado y que el compuesto por sí mismo o en combinación con los compuestos en la preparación, no pueda causar un efecto biológico y farmacológico significativo. De hecho, se han identificado muchos compuestos farmacológicos importantes (entidades químicas individuales) y se han aislado a partir de plantas que se utilizan en preparaciones herbarias. Con estos compuestos puros, la eficacia terapéutica con frecuencia excede la que se puede lograr con las preparaciones herbarias que contienen los compuestos.

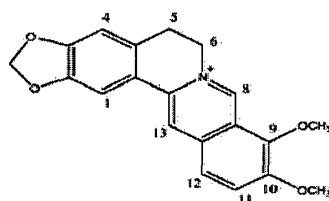
45 Las formulaciones farmacéuticas herbarias tópicamente que incluyen extractos vegetales ricos en berberina se han usado durante siglos en el tratamiento de diversas dolencias, incluyendo una variedad de trastornos de la piel, tales como psoriasis, acné, eccema, etc. Estas preparaciones herbarias tópicamente han logrado resultados variables. En algunas de las preparaciones, el extracto que contiene berberina consiste en aproximadamente el 10 % de los diversos componentes usados para constituir la formulación. Se ha estimado que el compuesto de berberina en estas preparaciones totales tópicamente constituye aproximadamente el 0,1 % (p/p) de las formulaciones terminadas³².

50 En base al razonamiento anterior, se ha investigado *in vitro* los efectos de la berberina a diversas concentraciones sobre las rutas biológicas que pueden estar implicadas en la patogénesis de la rosácea. En base a estos resultados y al razonamiento que se ha descrito anteriormente, se han desarrollado formulaciones farmacéuticas tópicamente químicamente definidas que contienen berberina en porcentajes

definidos que son más altos que las concentraciones de berberina en las formulaciones farmacéuticas herbarias tradicionales que contienen berberina. Después, se ensayaron estas formulaciones sobre el área de piel afectada en pacientes con rosácea. Los hallazgos indican que las formulaciones farmacéuticas tópicas que contienen berberina por encima del 0,1 % (p/p) pueden lograr resultados 5 eficaces y tolerables en el tratamiento de la rosácea y trastornos de enrojecimiento de cara sensible relacionados.

Análogos de berberina

10 La estructura de la berberina (5,6-dihidro-9,10-dimetoxibenzo(g)-1,3-benzodioxolo (5,6-a) quinolizinio) se muestra a continuación:



berberina

Se pueden preparar varios alcaloides de protoberberina con actividad biológica variable similar a la 15 berberina, tal como: jatrorrhizina, palmatina, coptisina, 9-desmetilberberina, 9-desmetilpalmatina, 13-hidroberberina, berberrubina, palmatrubina, 9-O-etilberberrubina, 9-O-etil-13-etilberberrubina, sal N-metílica de 13-metildihidroberberina, tetrahidroprotoberberinas^{33,34} y sus sales N-metílicas, 13-Hexilberberina, 13-hexilpalmatina y cloruro de 9-lauroilberberrubina.

20 La palmatina está presente en plantas de varias familias, de manera más notable en los rizomas de *Fibrarurea Tinctoria* Lour. La palmatina es un alcaloide de isoquinolina y las formulaciones que contienen palmitina se han usado ampliamente en China para el tratamiento de inflamación ginecológica, disentería por bacilos, enteritis, infección del tracto respiratorio, infección de vías urinarias. Adicionalmente, la palmatina tiene la función de actividades anti-arrítmicas, antisépticas, bacteriostáticas, y antivíricas. La 25 palmatina también se puede utilizar como un compuesto en el cribado de fármacos anti-tumor³⁵. Se ha producido un producto farmacéutico que contiene palmatina como inhibidor de crecimiento del cabello tópico (Keramene, Divine Skin Solutions D S Laboratories Keramene Body Hair Minimizer).

La coptisina es un alcaloide que se encuentra en la planta "hilo dorado" china (*Coptis chinensis*). Se usa 30 en la medicina herbaria china junto con el compuesto relacionado berberina para tratar trastornos digestivos causados por infecciones bacterianas. La coptisina también muestra algo de inhibición significativa sobre el crecimiento tumoral. La coptisina ha demostrado *in vitro* que es citotóxica en la línea de célula de colon de tumor de humano³⁶, hepatoma humano y en las líneas celulares de leucemia³⁷.

35 En estos estudios, también se ha investigado *in vitro* e *in vivo* los efectos de palmatina, y coptisina a diversas concentraciones sobre rutas biológicas que pueden estar implicadas en la patogénesis de la rosácea. En base a estos resultados y el razonamiento que se ha descrito anteriormente, también se han desarrollado formulaciones farmacéuticas tópicas químicamente definidas que contienen palmatina o coptisina a concentraciones definidas. Estas formulaciones pueden lograr resultados eficaces y 40 tolerables en el tratamiento de rosácea y trastornos de enrojecimiento de cara sensible relacionados.

Ejemplo 1: Efectos de la berberina sobre la inhibición de secreción de citocina inducida por péptidos de catelicidina por queratinocitos humanos (ensayo *in vitro*)

45 Para el presente estudio *in vitro*, se disolvió berberina (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) en agua, metanol, etanol o sulfóxido de dimetilo (DIVISO). Se cultivaron queratinocitos normales humanos

(Invitrogen, CA, Estados Unidos) en medio EpiLife (Invitrogen, CA, Estados Unidos) complementado con Ca^{+2} 0,06 mM, complemento de crecimiento definido EpiLife al 1 %, y penicilina al 1 %/estreptomicina (Invitrogen, CA, Estados Unidos). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5 % y aire al 95 %. Los queratinocitos humanos se cultivaron hasta confluencia y se trataron con péptidos sintéticos de catelicidina (LL-37) (6,4 μM) durante 16 horas para inducir una respuesta inflamatoria similar a la observada en la rosácea. Algunos de los cultivos de queratinocito tratados con catelicidina se incubaron conjuntamente con berberina con concentraciones de la misma de 1,25 $\mu\text{g/ml}$ a 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Los cultivos de queratinocitos tratados con catelicidina o catelicidina con etanol al 1 % y sin berberina se usaron como controles negativos. Los sobrenadantes se recogieron y se colocaron en una placa estéril de 96 pocillos para ELISA de interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 alfa (IL-1 alfa), y factor de crecimiento celular epitelial venoso (VEGF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, MN, Estados Unidos).

El resultado mostró que la catelicidina puede inducir la liberación de IL-8, IL-1 alfa y VEGF a partir de queratinocitos humanos cultivados. El efecto inhibitorio de berberina sobre la liberación de IL-8 (figura 1A), IL-1 alfa (figura 1B) y VEGF (figura 1C) se examinó añadiendo diferentes concentraciones (0~12,5 $\mu\text{g/ml}$) de berberina en el medio de cultivo. Hubo un descenso del 31,4 %, 24,9 % y 29,1 % en la liberación de IL-8, IL-1 alfa y VEGF respectivamente, cuando los queratinocitos estimulados con catelicidina se trataron con 1,25 $\mu\text{g/ml}$ de berberina en comparación con el control de etanol al 1 % tratado con péptido de catelicidina ($P < 0,05$). Estos resultados mostraron que la berberina puede inhibir de manera significativa la respuesta inflamatoria inducida por catelicidina de una manera dependiente de la dosis, especialmente cuando la concentración de berberina es mayor de 6,25 $\mu\text{g/ml}$, lo que indica que la berberina tiene actividad antiinflamatoria contra la liberación inducida por catelicidina de citocinas, que están relacionadas con la rosácea.

Ejemplo 2: Preparación de formulaciones farmacéuticas tópicas que contienen berberina y palmatina purificadas en porcentajes definidos

En base al razonamiento que se ha descrito anteriormente, las formulaciones farmacéuticas tópicas que contienen berberina de esta invención tienen una característica clave: contienen berberina purificada en porcentajes definidos que son más altos que los que se pueden obtener en formulaciones anteriores usando extractos de plantas ricas en berberina. Los intervalos de concentraciones se sometieron a ensayos en estudios de modelos animal y en estudios clínicos en humanos.

Para los presentes estudios en modelos animales y pacientes humanos, la berberina purificada se disolvió en etanol al 100 %, y después se añadió agua para alcanzar una concentración deseada de berberina en la solución final. En la formulación de gel, por ejemplo, se preparó berberina al 0,1 % o 0,2 % en etanol al 10 %. La solución o formulación de gel se tapó y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Los resultados de los presentes estudios en modelos animales y pacientes humanos con rosácea indican que la concentración de berberina en la formulación debe ser del 0,1 % o más, con el fin de obtener resultados consistentemente satisfactorios. Estas concentraciones son más altas que las de las formulaciones tópicas que contienen berberina que se han preparado previamente usando extractos de planta rica en berberina.

Los experimentos se continúan para preparar formulaciones en forma de una pomada, gel, crema, loción o pulverización, que son más apropiadas para su uso por personal clínico y los pacientes. En las formulaciones farmacéuticas tópicas de la presente invención, la berberina o un análogo biológicamente equivalente de berberina (por ejemplo, palmatina y coptisina) es el único o el principal compuesto farmacológico activo. La palmatina purificada usada para estos estudios se disuelve en agua al 100 %, y después se diluye para alcanzar en la solución o formulación de gel final con concentraciones de palmitina definidas, por ejemplo, 0,02 %, 0,1 %, o 0,2 % de palmitina.

Sin embargo, las formulaciones mejoradas o modificadas pueden incluir ingredientes adicionales para aumentar la solubilidad, emulsificación, lubricación, actividad antibiótica, o hidratación de la berberina o

su análogo.

Una realización preferida de esta invención para aumentar la solubilidad de la berberina o un análogo biológico equivalente de berberina, es añadir glicerol a la formulación. Una realización de esta invención para aumentar la actividad antibiótica de la formulación es añadir el extracto vegetal que ha demostrado tener actividad antibiótica. Una realización para aumentar la propiedad de hidratación de la formulación tópica de la presente invención es añadir ácido hialurónico.

10 **Ejemplo 3: Efectos de la preparación farmacéutica tópica de esta invención en un modelo de ratón de rosácea**

El modelo animal de rosácea: el modelo animal de rosácea se adopta a partir de lo indicado previamente¹⁸. En resumen, a ratones BALB/c y C57BL/6, afeitados 24 h antes de los tratamientos, se les inyectó por vía subcutánea en el lomo 40 µl de péptido de catelicidina (320 µM) dos veces al día. Cuarenta y ocho horas después de la inyección inicial (cuatro inyecciones en total), se observó eritema y edema en el sitio inyectado imitando los rasgos clínicos de la rosácea.

En estos experimentos, los ratones inyectados con catelicidina se trataron con o sin berberina tópica dos veces al día para observar el efecto de berberina sobre la reducción de la inflamación. Los resultados mostraron que los ratones a los que se les administró inyecciones de péptidos de catelicidina por vía subcutánea indujeron eritema y dilatación vascular en la piel, que se parecía a los rasgos clínicos de la rosácea después de 48 h. Los ratones inyectados con catelicidina después se dividieron en 2 grupos, que se trataron con berberina (n = 3) o no se trataron con berberina (n = 3; como controles), respectivamente, durante 2 días posteriores. La formulación tópica que contenía berberina al 0,1 % se aplicó en sobre las lesiones inducidas por catelicidina dos veces al día. Las lesiones eritematosas o inflamatorias duraron más de 7 días en el grupo de control. El 4º día, el eritema y la dilatación vascular se redujeron significativamente en el grupo tratado con berberina en comparación con los controles. Estos resultados indican que la berberina tópica puede reducir la reacción inflamatoria inducida por catelicidina *in vivo*.

30

Ejemplo 4: Un estudio clínico en seres humanos que investiga la eficacia de la formulación farmacéutica tópica de esta invención en pacientes con rosácea

Método: Se realizó un estudio clínico abierto para determinar la eficacia de las formulaciones tópicas de berberina de esta invención para el tratamiento de rosácea y trastornos relacionados con la piel. Los pacientes incluidos en este estudio fueron diagnosticados por los dermatólogos con rosácea clínicamente definida. A todos los pacientes se les administró gel de berberina al 0,1 % dos veces al día durante 6 semanas. En los puntos de tiempo de inicio de tratamiento, y 2 semanas y 6 semanas después del tratamiento, los pacientes se evaluaron respecto a sus síntomas de rosácea. A los pacientes no se les permitió utilizar otros medicamentos, incluyendo antibióticos, para sus afecciones dérmicas. Solamente se permitieron antihistamínicos orales para el alivio de los síntomas de prurito.

Para evaluar la eficacia del tratamiento, se usó el sistema de calificación estándar para rosácea desarrollado por el Comité de Expertos de la Sociedad Nacional para la Rosácea sobre la Clasificación y Graduación de Rosácea³. Adicionalmente, se puntuaron la valoración global el investigador (IGA) y la gravedad de eritema general de los pacientes en la semana 0, semana 2, y semana 6 de la terapia con berberina. La IGA se expresó de acuerdo con un sistema de calificación de 7 puntos con un intervalo de 0 (claro) a 6 (grave). La gravedad del eritema facial general y telangiectasia, respectivamente, se valoró como "ninguna", "ligero", "moderado", o "grave" con puntuaciones de 0 a 3. El sistema de graduación utilizado para evaluar la gravedad del eritema facial general se describió previamente³⁸.

Resultados: En este estudio se incluyeron un total de 20 pacientes con rosácea (18 mujeres y 2 hombres). La edad promedio de la población de estudio fue de 43,3 (19-85) años. La duración promedio de la rosácea antes del tratamiento con berberina fue de 4 (1-24) años. Entre los 20 pacientes con

rosácea, 13 casos eran del tipo eritematotelangiectático (65 %), 7 casos del pápulopustular (35 %), y 5 casos (25 %) del tipo fimatoso.

De acuerdo con el sistema de calificación de 7 puntos, la puntuación de IGA de rosácea en la línea basal 5 (inicio del tratamiento) fue de $4,1 \pm 1,3$. Esta puntuación disminuyó a $2,6 \pm 0,9$ en la semana 2, después $1,6 \pm 0,8$ en la semana 6. La diferencia de las puntuaciones de IGA entre la semana 0, la semana 2, y la semana 6 fue estadísticamente significativa (W2 frente a W0: prueba de t apareada $P < 0,0001$; W6 frente a W0: prueba de t apareada $P < 0,0001$). Al comienzo del tratamiento, la mayoría de los pacientes (95 %) tenía un grado de ligero a moderado (3) a grave (6). Al final del tratamiento, 19 de los 20 10 pacientes (95 %) tenían una clasificación de ligero (2) a claro (0).

La gravedad del eritema general evaluado por el investigador fue de $2,35 \pm 0,6$ al inicio del tratamiento, $1,5 \pm 0,5$ en la semana 2, y $0,95 \pm 0,4$ en la semana 6. La mejora en la semana 2 o en la semana 6 fue estadísticamente significativa (W2 frente a W0: prueba de t apareada $P < 0,0001$; W6 frente a W0: 15 prueba de t apareada $P < 0,0001$). Al comienzo del tratamiento, la mayoría de los pacientes (95 %) tenía eritema clasificado de moderado (2) a grave (3). Al final del tratamiento, 19 de los 20 pacientes (95 %) tenía una calificación de eritema de ligero (1) a ninguno (0).

Seguridad y tolerabilidad: No hubo ningún evento adverso grave durante el estudio. Solamente 2 20 casos (10 %) tuvieron sensación de comezón/picazón transitoria en el área de medicación tópica, pero fueron tolerables sin que hubiera que interrumpir el estudio.

Ejemplo 5: La berberina tópica es eficaz para el tratamiento de dermatitis tipo rosácea inducida por esteroides y dermatitis acneiforme inducida por inhibidores de EGFR

25 También se estudió el gel berberina al 0,1 % en 10 pacientes con dermatitis tipo rosácea inducida por esteroides y 5 pacientes con dermatitis acneiforme inducida por inhibidores de EGFR, usando un régimen de dos veces al día durante 6 semanas. Los 15 pacientes mostraron una respuesta eficaz y tolerada como la observada con rosácea.

30 **Ejemplo 6: La palmitina mostró eficacia para el tratamiento de la rosácea o trastornos de enrojecimiento de la cara**

También se estudió la formulación tópica que contenía palmatina al 0,02 % (p/p) en 10 pacientes con 35 rosácea y trastornos de enrojecimiento de la cara relacionados. Los 10 pacientes muestran una respuesta eficaz y tolerada como la observada con berberina.

Conclusión hecha a partir de los ejemplos

40 Los estudios de cultivo *in vitro* han demostrado que la berberina muestra efectos antiinflamatorios mediante la inhibición de la producción de IL-8, IL-1 alfa y VEGF inducida por catelicidina por parte de los queratinocitos humanos. Dado que la inflamación está implicada en la patogénesis de la rosácea y trastornos dérmicos relacionados, los efectos antiinflamatorios de la berberina pueden explicar su efecto clínicamente beneficioso en la rosácea y los trastornos inflamatorios de la piel relacionados.

45 Los resultados de estos estudios clínicos han demostrado que las formulaciones farmacéuticas tópicas de esta invención que contienen berberina purificada a concentraciones mayores del 0,1 % o palmatina a concentraciones mayores del 0,02 % pueden ser eficaces, seguras y bien tolerables para el tratamiento de rosácea y trastornos relacionados con enrojecimiento de la piel, tales como acné, dermatitis por 50 contacto, dermatitis seborréica y fotodermatitis, dermatitis tipo rosácea inducida por esteroides, y dermatitis acneiforme inducida por inhibidores de EGFR.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. La berberina inhibió la liberación de IL-8, IL-1 alfa y VEGF inducida por péptido de catelicidina (LL-37) a partir de queratinocitos humanos. Los queratinocitos se estimularon con péptido de catelicidina (LL-37), y la liberación de IL-8 (figura 1A), IL-1 alfa (figura 1B) y VEGF (figura 1C) por parte de los queratinocitos se evalúa mediante ensayo ELISA.

5 Figura 2. La figura 2A muestra las puntuaciones de la evaluación global del Investigador al comienzo del tratamiento con berberina y a las 2 semanas y 6 semanas de tratamiento. B: Puntuaciones de gravedad de eritema general al inicio del tratamiento tópico con berberina y en la semana 2 y semana 6 del tratamiento.

10 REFERENCIAS CITADAS

1. Plewig G, Jansen T. Rosacea. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, et al., eds. *Dermatology in General Medicine*. 6th ed. New York, NY: McGraw-Hill Health Professions Division (2003) pp.688-696.
- 15 2. Lonne-Rahm SB, Fischer T, Berg M. Stinging and rosacea. *Acta Derm Venereol* 1999; 79:460-461.
3. Wilkin J, Dahl M, Detmar M, et al. Standard grading system for rosacea: report of the National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50:907-912.
- 20 4. Griffiths WA. The red face-an overview and delineation of the MARSH syndrome. *Clin Exp Dermatol*. 1999; 24:42-47.
5. Draelos ZD. Assessment of skin barrier function in rosacea patients with a novel 1% metronidazole gel. *J Drugs Dermatol*. 2005; 4:557-562.
6. Chen AY, Zirwas MJ. Steroid-induced rosacealike dermatitis: case report and review of the literature. *Cutis*. 2009 83(4):198-204.
- 25 7. Lee DH, Li K, Suh DH. Pimecrolimus 1% cream for the treatment of steroid-induced rosacea: an 8-week split-face clinical trial. *Br J Dermatol*. 2008; 158(5):1069-76.
8. Wollenberg A, Kroth J, Hauschild A, Dirschka T. Cutaneous side effects of EGFR inhibitors--appearance and management. *Dtsch Med Wochenschr*. 2010;135(4):149-54.
- 30 9. Lacouture ME, Maitland ML, Segaert S, et al. A proposed EGFR inhibitor dermatologic adverse event-specific grading scale from the MASCC skin toxicity study group. *Support Care Cancer*. 2010;18(4):509-22.
10. Palleschi GM, Torchia D. Rosacea in a monozygotic twin. *Australas J Dermatol*. 2007; 48:132-133.
- 35 11. Yazici AC, Tamer L, Ikizoglu G, Kaya TI, Api H, Yildirim H, Adiguzel A. GSTM1 and GSTT1 null genotypes as possible heritable factors of rosacea. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2006; 22:208-210.
12. Jansen T, Plewig G. Rosacea: classification and treatment. *J R Soc Med*. 1997; 90:144-150.
13. Wilkin JK. Rosacea. Pathophysiology and treatment. *Arch Dermatol*. 1994; 130:359-362.
- 40 14. Forton F, Seys B: density of Demodex folliculorum in rosacea: A case- control study using standardized skin-surface biopsy. *Br J Dermatol*. 1993; 128:650.
15. Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A, Dorschner RA, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Morhenn VB, Gallo RL. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med*. 2007; 13:975-980.
- 45 16. Zuyderduyn S, Ninaber DK, Hiemstra PS, Rabe KF. The antimicrobial peptide LL-37 enhances IL-8 release by human airway smooth muscle cells. *Allergy Clin Immunol*. 2006; 117:1328-1335.
17. Afonso AA, Sobrin L, Monroy DC, Selzer M, Lokeshwar B, Pflugfelder SC. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40:2506-2512.
- 50 18. Pu LL, Smith PD, Payne WG, Kuhn MA, Wang X, Ko F, Robson MC. Overexpression of transforming growth factor beta-2 and its receptor in rhinophyma: an alternative mechanism of pathobiology. *Ann Plast Surg*. 2000; 45:515-519.
19. Guarrera M, Parodi A, Cipriani C, et al. Flushing in rosacea: a possible mechanism. *Arch*

- Dermatol Res. 1982; 272:311-316.
20. Smith JR, Lanier VB, Braziel RM, Falkenhagen KM, White C, Rosenbaum JT. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rosacea. *Br J Ophthalmol*. 2007; 91:226-229.
- 5 21. McDonnell JK, Tomecki KJ. Rosacea: an update. *Clev Clinic J Med*. 2000; 67:587-590.
22. Gupta AK, Gover MD. Azelaic acid (15% gel) in the treatment of acne rosacea. *Int J Dermatol*. 2007; 46:533-538.
23. Berberine (2000). *Altern Med Rev*. 5:175-177
- 10 24. Yu HH, Kim KJ, Cha JD, et al. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Food*. 2005; 8:454-461.
25. Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther*. 2006; 5:296-308.
- 15 26. Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Lett*. 2004; 203:127-137.
27. Khosla PK, Neeraj VI, Gupta SK, Satpathy G Berberine, a potential drug for trachoma. *Rev Int Trach Pathol Ocul Trop Subtrop Sante Publique*. 1992; 69:147-65.
28. Meisner; Lorraine Faxon. Topical composition for the treatment of psoriasis and related skin disorders. United States Patent 6440465 (2002).
- 20 29. Goodless, Dean R. Composition and method for treatment of acne. United States Patent Application 20050158404 (2005).
30. Lintner; Karl. Compositions containing mixtures of tetrapeptides and tripeptides. United States Patent 6974799 (2005).
- 25 31. Gupta, Shyam K. Topical nutraceutical compositions with selective body slimming and tone firming antiaging benefits. United States Patent Application 20040146539 (2004).
32. Gulliver WP, Donsky HJ. A report on three recent clinical trials using *Mahonia aquifolium* 10% topical cream and a review of the worldwide clinical experience with *Mahonia aquifolium* for the treatment of plaque psoriasis. *Am J Ther*. 2005; 12:398-406.
- 30 33. Iwasa K, et al. Fungicidal and herbicidal activities of berberine related alkaloids. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2000; 64:1998-2000.
34. Iwasa K, Nanba H, Lee DU, Kang SI. Structure-activity relationships of protoberberines having antimicrobial activity. *Planta Med*. 1998; 64:748-751.
- 35 35. Prabal Giri, Maidul Hossain and Gopinatha Suresh Kumar. RNA specific molecules: Cytotoxic plant alkaloid palmatine binds strongly to poly(A). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006; 16:2364-2368.
36. Colombo M.L. et al. Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from Berberine. *Farmaco* 2001; 56:403-409.
37. Chun-Ching Lin et al. Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2004; 31:65-69.
- 40 38. Thiboutot D, Thieroff-Ekerdt R, Graupe K. Efficacy and safety of azelaic acid (15%) gel as a new treatment for papulopustular rosacea: results from two vehicle-controlled, randomized phase III studies. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48:836-845.
- 45 39. Gomez HJ. Pharmaceutical compositions for the treatment of psoriasis. United States patent application 2006/0286054 (2006).

REVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica tópica para su uso en el tratamiento de trastornos de la piel relacionados con el enrojecimiento de la cara, que comprende al menos el 0,02 % p/p de berberina o un
5 análogo biológicamente equivalente de berberina,
en la que el análogo biológicamente equivalente de berberina se selecciona entre el grupo que consiste en jatrorrhizina, palmatina, coptisina, 9-demetilberberina, 9-demetilpalmatina, 13-hidroiberberina, berberrubina, palmatrubina, 9-O-etilberberrubina, 9-O-etil-13-etilberberrubina, sal 13-
10 metildihidroberberina N-metilo, tetrahidroprotoberberinas y sales N-metilo del mismo, y cloruro de 9-
lauroilberberrubina, en la que berberina, o el análogo biológicamente equivalente de berberina, es el
único componente farmacéuticamente activo, y
en la que el trastorno de la piel relacionado con el enrojecimiento de la cara se selecciona entre el grupo
que consiste en rosácea, dermatitis seborreica, fotodermatitis, dermatitis por contacto, dermatitis tipo
15 rosácea inducida por esteroides, y dermatitis acneiforme inducida por inhibidores de EGFR.
2. La composición farmacéutica tópica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la
que el trastorno de la piel relacionado con el enrojecimiento de la cara es rosácea.
3. La composición farmacéutica tópica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la
20 que la concentración de berberina, o el análogo biológicamente equivalente de berberina, está entre
aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 2 % p/p.

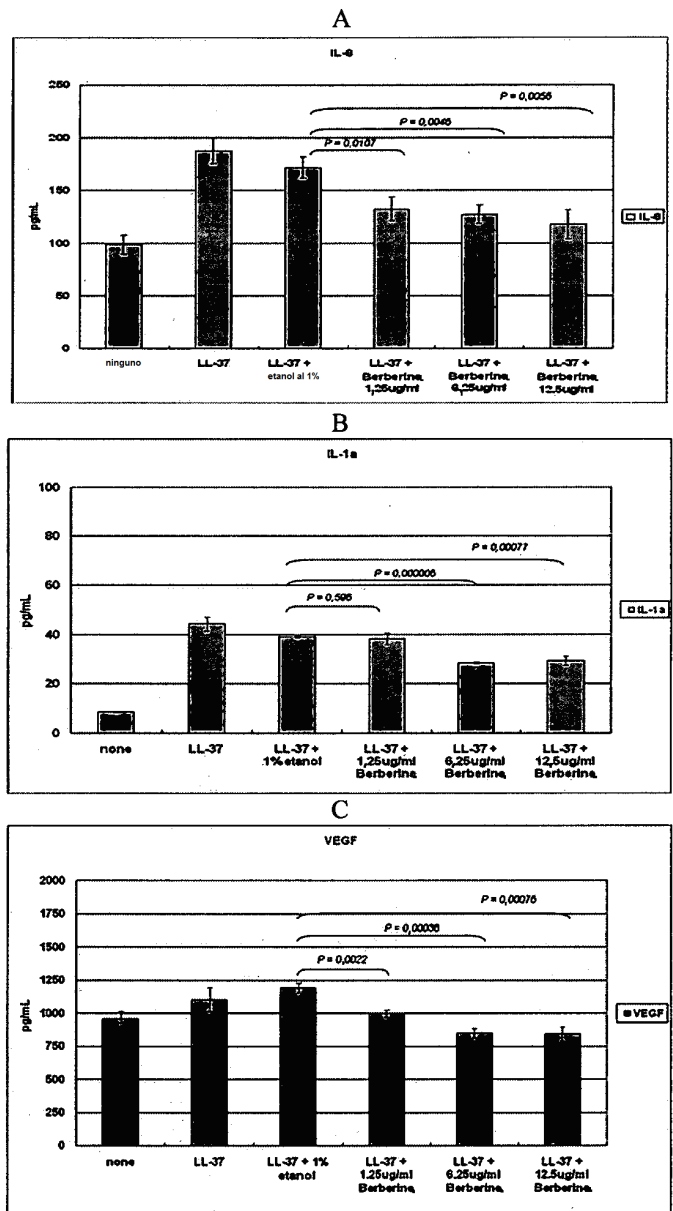


Figura 1

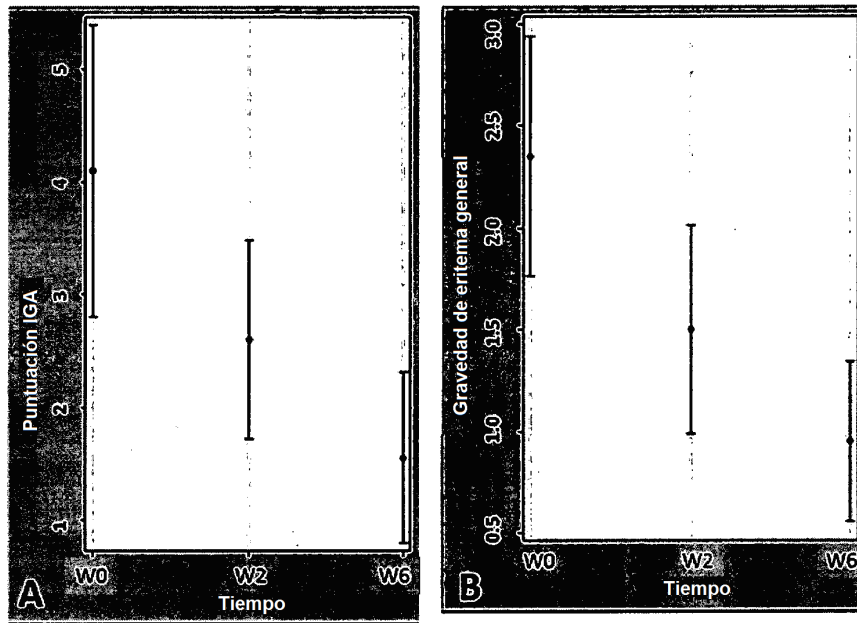


Figura 2