

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 458**

51 Int. Cl.:

A61K 36/738 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01)
A61K 36/66 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 17/08 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)
A61P 17/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2012 PCT/IB2012/056988**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13084163**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2012 E 12815804 (5)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2788011**

54 Título: **Composición que comprende un extracto de Chelidonium majus y Copaiba, y uso de la misma para el tratamiento de disfunciones cutáneas**

30 Prioridad:

05.12.2011 IT MI20112216

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2018

73 Titular/es:

**FONDAZIONE SALVATORE MAUGERI CLINICA
 DEL LAVORO E DELLA RIABILITAZIONE (50.0%)
 Via Salvatore Maugeri, 4
 27100 Pavia, IT y
 PURYTRA FARMACEUTICI S.P.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PIETRA, DANIELE;
 BORGHINI, ALICE;
 DEL CORSO, SIMONE;
 IMBRIANI, MARCELLO y
 BIANUCCI, ANNA**

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

Observaciones :

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

ES 2 687 458 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

Composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba*, y uso de la misma para el tratamiento de disfunciones cutáneas

5

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a composiciones que comprenden un extracto de *Chelidonium majus* y resina de *Copaifera officinalis* (*Copaiba*).

10

[0002] La invención también se refiere al uso de la composición en el campo de la medicina y de la cosmética para el tratamiento de lesiones cutáneas caracterizadas por hiperproliferación epidérmica y daño dérmico.

Estado de la técnica

15

[0003] La piel humana se compone principalmente de tres capas: una capa superior más delgada, la epidermis, una capa intermedia más gruesa, la dermis y una capa inferior de tejido subcutáneo.

20

[0004] Los queratinocitos son el tipo de célula más abundante en la dermis (75-80 % del número total de células en la epidermis humana), mientras que la dermis está compuesta principalmente por fibroblastos. Además, la piel está bien vascularizada con una red densa de vasos arteriales y venosos compuestos de células endoteliales vasculares.

25

[0005] Los factores subyacentes al mantenimiento de la homeostasis de la piel, es decir, mantenimiento de la morfología del tejido normal, son la correcta regulación de la proliferación, migración y viabilidad, y del metabolismo celular en general, de la actividad deshidrogenasa mitocondrial en fibroblastos y queratinocitos, de la concentración de radicales libres y del medio celular y extracelular oxidante y reductor, de las concentraciones de mediadores intracelulares e intercelulares tales como las citoquinas, de la producción de colágeno por fibroblastos, y de la colonización microbiana de la piel.

30

[0006] Se sabe que los cambios en los procesos mencionados anteriormente están implicados en diversas patologías y afecciones, incluyendo lesiones cutáneas caracterizadas por hiperproliferación epidérmica y daño dérmico, posiblemente asociadas con infecciones microbianas [Hernandez - Martinez, *Repair, regeneration and fibrosis*, en *Pathology*, ed. E. Rubin, J.L. Farber, Philadelphia, Lippincott, 1999; Satish L y Kathju S, *Dermatology Research and Practice*, 2010, Artículo ID 790234, 11 páginas].

35

[0007] En consecuencia, cada vez que se produce un estado de hiperproliferación de la epidermis, asociado a enfermedades y afecciones caracterizadas por una disminución de la regeneración y reparación de la piel (daño dérmico), y posiblemente asociado a lesiones vasculares y/o se asocia a una infección microbiana tal como, por ejemplo, en acné en la fase activa, en acné en la fase de curación, en presencia de piel impura, en el envejecimiento de la piel acnéica, pieles impuras y envejecimiento de la piel en general, en dermatitis atópica y en dermatitis en general, en presencia de placas psoriásicas, en discromías cutáneas, en hiperseborrea, en pústulas, en pápulas, en comedones, en fibrosis cutánea, en formación de cicatrices, en cicatrices acnéicas atróficas, en furúnculos, en talones agrietados, en presencia de pelos encarnados, en onicocriptosis, en callos de la piel, en verrugas, en queratosis y similares,

45

es deseable tener la estimulación de la viabilidad (efecto revitalizante) y/o proliferación y/o de la migración de fibroblastos y de células endoteliales vasculares, y la inhibición de la viabilidad y/o proliferación de queratinocitos, una reducción en la concentración de radicales libres (efecto anti-radicales y protector de la piel), una reducción en la concentración de interleucina-1 beta (efecto curativo), antagonismo contra el proceso inflamatorio y el daño oxidativo, antagonismo contra el proceso fibrótico y posiblemente la inhibición del crecimiento de microorganismos responsables de las infecciones microbianas de la piel.

50

[0008] *Chelidonium majus* (*C. majus*) es una planta herbácea perenne que crece espontáneamente en los bosques de la región mediterránea. Pertenece al género *Chelidonium* y a la familia *Papaveraceae*. Crece a una altura de 30-90 cm y se caracteriza por un látex de color amarillo anaranjado que se oxida y oscurece rápidamente en el aire, que sale de los tallos una vez que están rotos [Bruni A. (1999), *Farmacognosia generale e applicata* [*General and applied pharmacognosy*, PICCINNUOVA LIBRARIA SpA Padova, págs. 300-301].

55

[0009] *Chelidonium majus* contiene numerosas sustancias bioactivas, incluyendo compuestos que pertenecen a las siguientes clases químicas: alcaloides, ácidos, lactonas, carotenoides, vitaminas, flavonoides, fitoesteroides, saponinas y proteínas, que se han aislado e identificado analíticamente por métodos cromatográficos. [Kim HK *et al. Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1969, 58, 372-374; Slavik J y Slavikova L *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 1977, 42, 2686-2693; Slavik J *et al. L Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 1965, 30, 3697-3704; Tin-Wa M *et al. Journal of Natural Products*, 1972, 35, 87-89]. Los alcaloides isoquinolínicos son especialmente abundantes en *C. majus*. En particular, *C. majus* es rico en protopina, coptisina, estilopina, berberina, quelidonina, sanguinarina y queleritrina [Gu Y *et al. Journal of Separation Science*, 2010, 33, 1004-1009].

65

El uso de *C. majus* como agente queratolítico es conocido en medicina popular [Amenta R *et al. Fitoterapia [Phytotherapy]* Volumen 71, Suplemento 1, 2000, S13-S20]. También se conoce el uso de algunos de sus principales alcaloides como agentes queratolíticos [documentos WO09112226; US20060045930].

5 **[0010]** Sin embargo, dichas preparaciones de *C. majus* o de alcaloides de *C. majus* no tienen regeneración dérmica ni efectos estimulantes de la reparación dérmica, así como tampoco efectos estimulantes de la angiogénesis, ni efectos anti-fibróticos ni efectos anti-radicales. Además, los alcaloides tales como sanguinarina y queleritrina tienen efectos tóxicos e irritantes en la piel en cantidades habitualmente presentes en extractos de *C. majus*.

10 **[0011]** El documento WO2009/112226 describe composiciones farmacéuticas que comprenden los alcaloides sanguinarina, queleritrina y quelidonina, como extracto de *C. majus* para su uso en el tratamiento de papilomas, verrugas y placas psoriásicas.

15 **[0012]** El documento DE4031960 se refiere a una composición farmacéutica que comprende *C. majus* para el tratamiento de la psoriasis.

[0013] El documento FR2661330 describe composiciones farmacéuticas y cosméticas que comprenden *C. majus* para su uso en el tratamiento de durezas, callos y verrugas.

20 **[0014]** La resina de *Copaiba*, *Copaifera officinalis*, se define como una oleoresina (bálsamo de *Copaiba*) obtenida de *Copaifera officinalis* L., familia de las leguminosas [número de registro CAS: 9000-12-8/8001-61-4. EINECS/ELINCS: 232-526-3/232-288-0]. *Copaiba* está compuesta casi exclusivamente de terpenos. De estos, el principal es la beta-cariofilina, cuya proporción en la oleoresina varía desde aproximadamente el 20 % hasta aproximadamente el 60 %. *Copaiba* es conocida sobre todo por su efecto antiinflamatorio y su acción antimicrobiana, así como por su uso en la medicina popular para el tratamiento de lesiones cutáneas en general [Veiga Junior VF *et al. Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 112, 248-254; Oliveira dos Santos A *et al. Mem Inst Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro, 2008, 103, 277-281].

30 **[0015]** El aceite de *Rosa mosqueta* se obtiene de las semillas de *Rosa Aff. rubiginosa*, natural de los Andes sudamericanos conocida localmente como "*Rosa mosqueta*". El aceite contiene una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, aproximadamente 70-80 %, incluyendo derivados del ácido linoleico en una cantidad de 40-60 %. En medicina popular, el aceite de *Rosa mosqueta* se usa para el tratamiento de lesiones cutáneas en general.

35 **[0016]** Los compuestos de silicona, en particular dimeticona, son ampliamente usados en preparaciones dermatológicas como agentes emolientes y protectores de la piel.

[0017] Con el objetivo de ampliar la posibilidad de tratar estas enfermedades y afecciones, sigue existiendo la necesidad de una composición que sea eficaz en el tratamiento y la prevención de enfermedades y afecciones de la piel que requieren estimulación de la regeneración y reparación de la piel asociada a la inhibición de la hiperproliferación epidérmica y posiblemente la estimulación de la angiogénesis. En particular, se necesita una nueva composición que sea capaz de determinar la estimulación de la viabilidad y migración de fibroblastos y de células endoteliales vasculares, y la inhibición de la viabilidad de queratinocitos, y que también tenga efectos anti-fibróticos, cicatrizantes, citoprotectores y anti-radicales, y posiblemente también actividad antimicrobiana.

45 **[0018]** El objetivo de la presente invención es por lo tanto proporcionar composiciones particulares de *Chelidonium majus* y resina de *Copaifera officinalis* (*Copaiba*) que sean clínicamente seguras y utilizables para tratar diversos trastornos de la piel, tales como acné, piel impura, envejecimiento de la piel, dermatitis, psoriasis, discromías cutáneas, fibrosis cutánea, formación de cicatrices e hiperseborrea, y que no tengan las desventajas mencionadas anteriormente de las composiciones conocidas para la misma aplicación.

Sumario de la invención

55 **[0019]** El objetivo indicado anteriormente se ha logrado con composiciones que comprenden un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba*.

[0020] Sorprendentemente, se descubrió que las formulaciones de la invención muestran uno o más de los siguientes efectos:

- 60 - actividad eliminadora frente a radicales libres,
 - modulación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial,
 - modulación de la producción de colágeno,
 - modulación de la producción de IL-1 β ,
 - modulación de la producción de IL-6,
 65 - modulación de la migración celular,
 - actividad antimicrobiana,

- ausencia de efectos irritantes.

[0021] Los efectos anteriores indican que las formulaciones relacionadas son muy adecuadas para sus usos en los campos médico y cosmético descritos más adelante.

5

Usos en los campos médico y cosmético

[0022] Anti-radical (protector de la piel): esto se deduce de los efectos eliminadores de radicales libres.

10 [0023] Revitalizante: esto se deduce del efecto de aumentar la actividad deshidrogenasa mitocondrial.

[0024] Anti-fibrótico (contra la formación de cicatrices en general, contra la formación de cicatrices atróficas, contra la formación de cicatrices hipertróficas, contra la formación de cicatrices acnéicas): esto se deduce de un efecto antagónico sobre la estimulación del colágeno inducida por 34 ng/ml de TGF-β1 y de un efecto antagónico sobre la estimulación de IL-1β y/o IL-6 inducida por 34 ng/ml de TGF-β1, y de la inhibición de la producción de IL-1β y/o IL-6 en condiciones de crecimiento convencional.

15

[0025] Citoprotector contra el daño oxidativo (antioxidante, antiinflamatorio y anti-envejecimiento): esto se deduce de un efecto antagónico sobre la estimulación de IL-1β y/o de IL-6 inducido por 100 μM de H₂O₂ y la ausencia de cambios en la morfología celular que se refiere a la senescencia celular.

20

[0026] Curación de heridas: esto se deduce de un efecto inhibidor sobre la producción de IL-1β y de un efecto estimulante sobre la proliferación celular en condiciones de crecimiento convencional. Antimicrobiano: esto se deduce de una acción inhibidora sobre el crecimiento de microorganismos tales como bacterias, levaduras y/u hongos.

25

Efectos tóxicos

[0027] Citotoxicidad: esto se deduce de un efecto de reducción de la actividad deshidrogenasa mitocondrial, o la observación de cambios en la morfología celular, que se refiere a la senescencia celular.

30

[0028] Irritación: esto se deduce de un efecto de aumento de la producción de IL-6 y/o de IL-1β en condiciones de crecimiento convencional.

35 [0029] Por lo tanto, para las formulaciones de la invención, se descubrieron sorprendentemente las propiedades y características descritas a continuación.

Anti-radical

40 [0030] Las formulaciones (4 y 8) muestran efectos anti-radicales.

Colágeno

45 [0031] Las formulaciones (4 y 8) a la concentración del 0,1 % en condiciones de crecimiento convencional muestran una tendencia a inhibir la producción de colágenos. También antagonizan la estimulación del colágeno inducida por 34 ng/ml de TGF-β1. Por el contrario, en presencia de 100 μM de H₂O₂, tienen una tendencia a antagonizar la reducción en colágeno inducida por H₂O₂.

50 [0032] A la concentración de 0,1 % p/v, las formulaciones causan la inhibición de la producción de colágeno asociada con los efectos anti-radicales (actividad eliminadora) que también tienden a contrarrestar la acción oxidante de H₂O₂ y por consiguiente sus efectos sobre la producción de colágeno.

IL-1β

55 [0033] Las formulaciones (4 y 8) a la concentración del 0,1 % en condiciones convencionales inhiben la producción de IL-1β. También antagonizan la producción de IL-1β inducida por 100 μM de H₂O₂ o por 34 ng/ml de TGF-β1.

IL-6

60 [0034] Las formulaciones (4 y 8) a la concentración del 0,1 % en condiciones de crecimiento convencional no influyen significativamente en la producción de IL-6. No muestran ningún efecto significativo sobre la producción de IL-6 inducida por 100 μM de H₂O₂. Sin embargo, antagonizan la producción de IL-6 inducida por 34 ng/ml de TGF-β1.

65 [0035] También se ha descubierto sorprendentemente que las composiciones de la invención, que contienen un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba*, muestran un efecto estimulante sobre la actividad deshidrogenasa

mitocondrial y la migración de fibroblastos y células endoteliales vasculares (véanse las Figs. 2 y 4, respectivamente), pero muestran un efecto inhibitorio sobre la actividad deshidrogenasa mitocondrial de los queratinocitos (véase la Figura 3). Este efecto es sorprendente ya que, aunque los extractos de *Chelidonium majus* estimulan la actividad deshidrogenasa mitocondrial de los fibroblastos a bajas concentraciones, y *Copaiba* en las mismas concentraciones inhibe notablemente la actividad deshidrogenasa mitocondrial de dichas células (véase la Figura 1b), cuando estas dos sustancias son usadas en una formulación en cantidades iguales en peso, se observa una marcada estimulación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial de los fibroblastos (véase la Figura 2). Esto significa que *Copaiba* no antagoniza el efecto estimulante de *C. majus* sobre la actividad deshidrogenasa mitocondrial; por el contrario, potencia dicho efecto. En otras palabras, la combinación de *Copaiba* con un extracto de *C. majus* en una formulación da como resultado una potenciación de los efectos estimulantes de la actividad deshidrogenasa mitocondrial de los fibroblastos si se compara con las sustancias individuales.

[0036] También se ha descubierto que el propilenglicol, usado como un ingrediente en ciertas formulaciones preferentes, muestra actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos, bacterias, hongos y levaduras.

[0037] Por lo tanto, los resultados de esta investigación llevaron a los autores a las conclusiones que se notifican a continuación y a la identificación de usos en los campos médico y cosmético para las formulaciones de la invención: las formulaciones no presentan efectos tóxicos (citotóxicos e irritantes).

[0038] Además, se descubrió sorprendentemente que las formulaciones de la invención se pueden usar como agentes anti-radicales (por ejemplo, como protectores de la piel), agentes revitalizantes de la piel, agentes anti-fibróticos (por ejemplo, como profilácticos de la formación de cicatrices, incluyendo cicatrices de acné), agentes citoprotectores (por ejemplo, como agentes antioxidantes, antiinflamatorios y anti-envejecimiento, particularmente útiles para el tratamiento del acné), agentes de curación de heridas y posiblemente agentes antimicrobianos.

[0039] Según otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba*, en la que dicha composición comprende berberina y beta-cariofileno, en la que la relación entre la cantidad en peso de beta-cariofileno y la cantidad en peso de berberina se sitúa en el intervalo de 7.000 a 60.000.000.

[0040] En otro aspecto adicional, la invención se refiere a una composición en la que dicho extracto de *Chelidonium majus* comprende protopina, estilopina, quelidonina, sanguinarina, berberina, queleritrina y coptisina y en la que:

- la relación entre la cantidad en peso de estilopina y la cantidad total en peso de sanguinarina, queleritrina, quelidonina y protopina es superior o igual a 5;
- la relación entre la cantidad en peso de berberina y la cantidad total en peso de sanguinarina, queleritrina, quelidonina, protopina es superior o igual a 1; y
- la relación entre la cantidad en peso de berberina y la cantidad en peso de coptisina en el extracto de *Chelidonium majus* es superior o igual a 0,05.

[0041] Según otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba* y aceite de *Rosa mosqueta*.

[0042] De hecho, también se descubrió sorprendentemente que el aceite de *Rosa mosqueta* potencia adicionalmente los efectos estimulantes de la actividad deshidrogenasa mitocondrial de los fibroblastos de la composición que comprende *Copaiba* y un extracto de *Chelidonium majus* (véase la Figura 2, ejemplos 3, 4, 7 y 8).

[0043] Según otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba* y un compuesto de silicona, preferentemente dimeticona.

[0044] De hecho, se descubrió sorprendentemente que la presencia de un compuesto de silicona en una composición no altera los efectos moduladores de la actividad deshidrogenasa mitocondrial de la composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba* y aceite de *Rosa mosqueta* (véanse las Figs. 2, 3 y 4, ejemplos 1, 2, 3 y 4).

[0045] Las composiciones de la invención que comprenden un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba*, y que posiblemente contienen aceite de *Rosa mosqueta* y un compuesto de silicona, se formulan preferentemente en forma de un gel.

[0046] De hecho, también se ha descubierto sorprendentemente que la formulación en forma de gel no altera los efectos moduladores de la actividad deshidrogenasa mitocondrial de la composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba* y aceite de *Rosa mosqueta* (véanse las Figs. 2, 3 y 4).

[0047] De acuerdo con lo anterior, puede deducirse que tal modulación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial determinada por una composición de la invención tendrá un efecto beneficioso sobre el tratamiento y la

prevención de enfermedades y afecciones de la piel que requieren estimulación de la regeneración y reparación de la dermis asociada con la inhibición de la hiperproliferación epidérmica y posiblemente la estimulación de la angiogénesis.

5 **[0048]** Además, en consideración de la actividad eliminadora sobre radicales libres, los efectos moduladores de la actividad deshidrogenasa mitocondrial, los efectos moduladores de la producción de IL-1 β , los efectos antagonistas sobre la liberación de interleucinas IL-6 e IL-1 β inducida por TGF- β 1 o por H₂O₂, los efectos antagonistas sobre la producción de colágeno inducida por TGF- β 1 y la actividad antimicrobiana del propilenglicol, los autores descubrieron sorprendentemente que las formulaciones de la invención se pueden usar como agentes anti-radicales (por ejemplo, como protectores de la piel), agentes revitalizantes de la piel, agentes anti-fibróticos (por ejemplo, como profilácticos de la formación de cicatrices, incluyendo cicatrices de acné), agentes citoprotectores (por ejemplo, como agentes antioxidantes, antiinflamatorios y anti-envejecimiento, también útiles para el tratamiento del acné), agentes de curación de heridas, y posiblemente agentes antimicrobianos.

15 **[0049]** En particular, los autores han descubierto que, en vista de la actividad antimicrobiana ejercida por propilenglicol, las formulaciones de la invención que contienen un extracto glicólico de *C. majus* se pueden usar como agentes antimicrobianos. En particular, en vista de la capacidad del propilenglicol para inhibir el crecimiento de *Propionibacterium acnes*, las formulaciones de la invención que contienen un extracto glicólico de *C. majus* se pueden usar como agentes anti-acné.

20 **[0050]** Por lo tanto, el uso de formulaciones de la invención en los campos médico y cosmético se resume de la siguiente manera:

- uso como agentes anti-radicales con propiedades de protección de la piel, ya que ejercen una acción eliminadora en el radical DDPH,
- uso como agentes revitalizantes de la piel, ya que son capaces de estimular la actividad deshidrogenasa mitocondrial en fibroblastos dérmicos,
- uso como agentes anti-fibróticos y, por lo tanto, como profilácticos en la formación de cicatrices, incluyendo las cicatrices del acné, ya que antagonizan la producción de colágeno, IL-6 e IL-1 β estimulada por TGF- β 1 en fibroblastos dérmicos,
- uso como agentes citoprotectores y, por lo tanto, como agentes antioxidantes, antiinflamatorios y anti-envejecimiento, también útiles para el tratamiento del acné, ya que antagonizan la producción de IL-6 e IL-1 β estimulada por H₂O₂ en fibroblastos dérmicos,
- uso como agentes de curación de heridas, ya que son capaces de reducir la producción de IL-1 β en fibroblastos dérmicos,
- uso como agentes antimicrobianos, incluyendo el caso del tratamiento del acné, ya que para las formulaciones preferentes de la invención que contienen propilenglicol a una dosificación son capaces de ejercer una acción antimicrobiana contra microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus niger*.

40 **[0051]** En otro aspecto adicional, la invención se refiere a la composición de la invención para su uso en el tratamiento y la prevención de lesiones cutáneas, de enfermedades y afecciones de la piel, posiblemente asociadas con infecciones microbianas, que requieren estimulación de la regeneración dérmica y reparación asociadas con la inhibición de la hiperproliferación epidérmica y posiblemente la estimulación de la angiogénesis, en la que dichas enfermedades y afecciones de la piel se seleccionan preferentemente entre el grupo que consiste en acné en su fase activa, acné en su fase de curación, la presencia de piel impura, envejecimiento de la piel acneica, pieles impuras y envejecimiento de la piel en general, dermatitis atópica y dermatitis en general, presencia de placas psoriásicas, discromías cutáneas, hiperseborrea, pústulas, pápulas, comedones, fibrosis cutánea, formación de cicatrices, cicatrices acneicas atróficas, furúnculos, talones agrietados, presencia de pelos encarnados, onicocriptosis, callos de la piel, verrugas, queratosis y similares.

Breve descripción de los dibujos

55 **[0052]** Las características y ventajas de la presente invención resultarán obvias a partir de la descripción detallada dada a continuación, y de las realizaciones de ejemplo proporcionadas a modo de ilustración no limitativa, así como por los dibujos adjuntos, en los que:

60 La Figura 1 muestra el efecto de extractos de *C. majus*, *Copaiba* y aceite de *Rosa mosqueta* sobre la actividad deshidrogenasa mitocondrial de fibroblastos dérmicos humanos (FDH). En los gráficos, la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial se notifica en el eje y y como % frente a las concentraciones de la formulación (eje x). En particular:

65 La Figura 1a muestra el gráfico de la curva de dosis/respuesta a 6 concentraciones de: extracto glicólico de *C. majus* (EG), *Copaiba*, aceite de *Rosa mosqueta* (Olio_rosa) y tintura madre de *C. majus* (TM). Los ensayos se realizaron después de 18 horas con 8.000 células sembradas por pocillo;

La Figura 1b muestra el gráfico de la curva dosis/respuesta a 6 concentraciones de: extracto glicólico de *C.*

majus (EG), *Copaiba*, aceite de *Rosa mosqueta* (Olio_rosa) y tintura madre de *C. majus* (TM). Las lecturas se realizaron después de 42 horas con 2.000 células sembradas por pocillo;

La Figura 2 muestra el efecto de ocho formulaciones sobre la actividad deshidrogenasa mitocondrial de fibroblastos dérmicos humanos (FDH). Las curvas de dosis/respuesta se trazaron en 6 concentraciones. Las lecturas se realizaron después de 42 horas con 2.000 células sembradas por pocillo. En los gráficos, la actividad deshidrogenasa mitocondrial en % se da en el eje y frente a las concentraciones de formulación dadas en el eje x.

La Figura 3 muestra el efecto de ocho formulaciones de la invención sobre la actividad deshidrogenasa mitocondrial de los queratinocitos epidérmicos humanos (QEH). En particular, las curvas dosis/respuesta se muestran en 6 concentraciones. Las lecturas se realizaron después de 24 horas con 8.000 células sembradas por pocillo.

La Figura 4 muestra las ocho formulaciones de la invención sobre la actividad deshidrogenasa mitocondrial en células endoteliales vasculares umbilicales humanas (CEVUH). En particular, la curva de dosis/respuesta se muestra en 6 concentraciones. Las lecturas se realizaron después de 24 horas con 8.000 células sembradas por pocillo.

La Figura 5 muestra imágenes fotomicrográficas a diversos aumentos de FDH con tinción de colágeno con rojo sirio y se sometieron a diversos tratamientos con las formulaciones 4 y 8 a las concentraciones especificadas, durante 24 horas, en condiciones de crecimiento convencional.

La Figura 6 muestra imágenes fotomicrográficas a diversos aumentos de FDH con tinción de colágeno con rojo sirio y se sometieron a diversos tratamientos con las formulaciones 4 y 8 a las concentraciones especificadas, durante 24 horas, en presencia de 100 μ M de H₂O₂.

La Figura 7 muestra imágenes fotomicrográficas a diversos aumentos de FDH con tinción de colágeno con rojo sirio y se sometieron a diversos tratamientos con las formulaciones 4 y 8 a las concentraciones especificadas, durante 24 horas, en presencia de 34 ng/ml de TGF- β 1.

Descripción detallada de la invención

[0053] La invención se refiere así a una composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba*.

[0054] Como las composiciones están destinadas a su uso en los campos cosmético y médico-farmacéutico, tales composiciones y tales extractos han de ser clínicamente seguros y adecuados para su uso en el tratamiento de diversas infecciones de la piel.

[0055] Un objeto de la presente invención es una composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba*.

[0056] En una realización preferente, la invención se refiere a una composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba*. Dicha composición comprende berberina y beta-cariofileno, en la que la relación entre la cantidad en peso de beta-cariofileno y la cantidad en peso de berberina varía de 7.000 a 60.000.000.

[0057] Para los fines de la presente invención:

- "*Chelidonium majus*" o "*C. majus*" o "celidonia" significa una planta herbácea perenne de la región mediterránea que pertenece al género *Chelidonium* y a la familia *Papaveraceae* y se caracteriza por un látex de color amarillo anaranjado, que sale de los tallos una vez se rompen y se oxida rápidamente (oscurece) en el aire. La invención tiene por objeto comprender todas las variedades y subespecies de la planta, tales como *Chelidonium majus* var. *majus* y *Chelidonium majus* var. *laciniatum*;
- "Partes aéreas de la planta de *Chelidonium majus*" significa los órganos de la planta que, en condiciones naturales, se desarrollan sobre el suelo, tales como flores, brotes y hojas;
- "Extracto de *Chelidonium majus*" significa una preparación líquida (extracción de fluidos), una preparación sólida (extracción en seco) o una preparación de consistencia intermedia (extracción suave) obtenida por el procedimiento de extracción de la totalidad o parte de la planta de *Chelidonium majus*, en la forma de una planta fresca o secada al aire o liofilizada o después de someterse a cualquier otro procedimiento de estabilización o conservación.
- "Copaiba" significa la resina de *Copaifera officinalis*, una oleorresina (bálsamo de *Copaiba*) obtenida de *Copaifera officinalis* L., *Leguminosae*; y
- "Aceite de *Rosa mosqueta*" significa un aceite obtenido de las semillas de *Rosa* Aff. *rubiginosa*, natural de los Andes sudamericanos.

[0058] En una realización preferente adicional, la composición según la invención comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba*, en la que dicho extracto de *Chelidonium majus* comprende protopina, estilopina, quelidonina, sanguinarina, berberina, queleritrina y coptisina y en la que:

- la relación entre la cantidad en peso de estilopina y la cantidad total en peso de sanguinarina, queleritrina, quelidonina y protopina es superior o igual a 5;

- la relación entre la cantidad en peso de berberina y la cantidad total en peso de sanguinarina, queleritrina, quelidonina, protopina es superior o igual a 1; y
- la relación entre la cantidad en peso de berberina y la cantidad en peso de coptisina en el extracto de *Chelidonium majus* es superior o igual a 0,05.

5 [0059] En una realización preferente adicional, la composición según la presente invención comprende además aceite de *Rosa mosqueta*.

10 [0060] De hecho, también se descubrió sorprendentemente que el aceite de *Rosa mosqueta* potencia adicionalmente los efectos estimulantes de la actividad deshidrogenasa mitocondrial de los fibroblastos de la composición que comprende *Copaiba* y un extracto de *Chelidonium majus* (véase la Figura 2, ejemplos 3, 4, 7 y 8).

15 [0061] En otro aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba* y propilenglicol.

[0062] En otro aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba* y un compuesto de silicona, preferentemente dimeticona.

20 [0063] De hecho, se descubrió sorprendentemente que la presencia de una silicona en la composición no altera los efectos moduladores de la actividad deshidrogenasa mitocondrial de la composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba* y aceite de *Rosa mosqueta* (véanse las Figs. 2, 3 y 4, ejemplos 1, 2, 3 y 4).

25 [0064] En otra realización preferente, la invención se refiere a una composición en la que la relación entre la cantidad en peso de beta-cariofileno y la cantidad en peso de compuesto de silicona se sitúa en el intervalo de 10 a 40.

[0065] Ventajosamente, la composición según la invención comprende aproximadamente 10 % de extracto de *Chelidonium majus* y aproximadamente 10 % de *Copaifera officinalis*, en referencia al total de la composición.

30 [0066] En una forma preferente, la invención se refiere a una composición de pago que comprende además una cantidad de aceite de *Rosa mosqueta* que varía de 5 a 10 % y una cantidad de dimeticona que varía de 0 a 0,5 %, en referencia al total de la composición.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a la composición según la invención para su uso en el tratamiento y la prevención de lesiones cutáneas caracterizadas por hiperproliferación epidérmica y daño dérmico.

35 [0067] La expresión "lesión cutánea caracterizada por hiperproliferación epidérmica y daño dérmico" significa estados en los que la hiperproliferación queratinocítica de la epidermis se produce en asociación con daño dérmico caracterizado por una regeneración y reparación de la dermis reducidas, es decir, estados tales como acné en la fase activa, acné en la fase de curación, presencia de piel impura, envejecimiento de piel acneica, pieles impuras y envejecimiento de la piel en general, dermatitis atópica y dermatitis en general, presencia de placas psoriásicas, discromías cutáneas, hiperseborrea, pústulas, pápulas, comedones, fibrosis cutánea, formación de cicatrices, cicatrices acneicas atróficas, furúnculos, talones agrietados, presencia de pelos encarnados, onicocriptosis, callos en la piel, verrugas, queratosis y similares.

45 [0068] Según otro aspecto, la invención se refiere a la composición de la presente invención para su uso en el campo cosmético.

[0069] Las composiciones cosméticas comprenden un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba* según la invención y un excipiente cosméticamente aceptable.

50 [0070] En ciertas realizaciones, el vehículo cosméticamente aceptable de la composición de la invención es un excipiente, vehículo o diluyente adecuado para las formulaciones farmacéuticas.

55 [0071] Las composiciones se pueden formular, por ejemplo, en geles, lociones, espumas, barras, ungüentos, leches o cremas.

[0072] En ciertas realizaciones, la composición según la invención se aplica a la piel en necesidad de tratamiento.

60 [0073] En ciertas realizaciones, la composición está en el producto sanitario, o en una forma farmacéutica medicinal para uso tópico.

[0074] En otro aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba*, para su uso en el tratamiento de lesiones cutáneas caracterizadas por hiperproliferación epidérmica y daño dérmico.

65

[0075] En una forma preferente, dichas lesiones cutáneas caracterizadas por hiperproliferación epidérmica y daño dérmico se seleccionan entre el grupo que consiste en acné, piel impura, envejecimiento de la piel, dermatitis, psoriasis, discromía cutánea, queratosis e hiperseborrea.

5 [0076] En una forma aún más preferente, las lesiones cutáneas caracterizadas por hiperproliferación epidérmica y daño dérmico se seleccionan entre el grupo que consiste en acné y queratosis.

10 [0077] Los extractos de *Chelidonium majus* se preparan mediante un procedimiento particular que puede ser ventajosamente un procedimiento de extracción (por ejemplo, extracción por maceración, extracción por infusión, extracción por digestión o extracción por percolación) y puede realizarse bajo diversas condiciones de temperatura, presión y tiempo de extracción.

15 [0078] Dicho extracto de *Chelidonium majus* es preferentemente un extracto obtenido de la planta fresca en propilenglicol. Ventajosamente, en dicho extracto, la relación entre la planta y el disolvente es del 20 % p/v y se realiza a temperatura ambiente durante 28 días. El extracto se recupera por decantación del solvente, presión de la sustancia y filtración de toda la mezcla.

20 [0079] Más preferentemente, dicho extracto se obtiene a partir de las partes aéreas de la planta de *Chelidonium majus*, seleccionadas entre el grupo que consiste en flores, brotes y hojas, preferentemente hojas sin las venas.

[0080] A continuación, se proporcionan realizaciones de ejemplos de la presente invención a modo de ilustración.

Ejemplos

25 **Ejemplo 1: PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS DE *C. MAJUS*, OLEORRESINA DE *COPAIBA* Y ACEITE DE *ROSA MOSQUETA***

Preparación del extracto glicólico de partes aéreas de *C. Majus* (EG)

30 [0081] Las partes aéreas de la planta, recogidas en el Monti Ernici (Roma, Italia) se picaron y se colocaron en una maceta en presencia de propilenglicol en una relación del 20 % p/v entre la planta y el disolvente, a temperatura ambiente durante 28 días. Después de este tiempo, el extracto se recuperó sedimentando el disolvente, también prensando todo el material y filtrando el producto líquido obtenido para eliminar cualquier partícula de hierba restante.

35

Preparación de la tintura madre de *C. majus* (TM)

40 [0082] Las partes aéreas de la planta, recogidas en el Monti Ernici (Roma, Italia) se picaron y se colocaron en una maceta en presencia de alcohol a 45 °C en una relación entre la planta y el disolvente del 33 % p/v, a temperatura ambiente durante 28 días. Después de este tiempo, el extracto se recuperó sedimentando el disolvente, también prensando todo el material y filtrando el producto líquido obtenido para eliminar cualquier partícula de hierba restante.

Preparación de la oleorresina de *Copaiba*

45

50 [0083] La oleorresina de *Copaifera officinalis* o *Copaiba* fue proporcionada por Beraca (San Paolo, Brasil). El procedimiento de preparación, según lo descrito por el proveedor, se presenta a continuación: se hacen dos orificios en el tronco del árbol de *Copaiba*, uno a una altura de 60-90 cm, y el otro 3-6 m más arriba. Una pieza de bambú tubular, dotada de un tapón simple, se ajusta en el agujero más bajo. En condiciones normales, el *Copaiba* fluye fácilmente y se recoge en tanques. Una vez completada la operación, ambos orificios se cierran con tapones simples, el árbol sigue creciendo, permitiendo otras futuras tomas de aceite de *Copaiba*.

Preparación del aceite de *Rosa mosqueta*

55 [0084] El aceite de *Rosa mosqueta* fue suministrado por Agrar srl (Roma, Italia). El procedimiento de preparación, según lo descrito por el proveedor, se presenta a continuación. Se preparó prensando en frío las semillas de *Rosa aeruginosa* procedentes de América del Sur, se refinaron, neutralizaron y estabilizaron con vitamina E natural a una concentración de 300 ppm.

60 [0085] El análisis anterior, se realizó por HPLC según una modificación del procedimiento descrito en Sarkozi A *et al. Chromatographia*, 2006, 63, págs. 81-86. Esta modificación permitió que también se identificara el alcaloide estilopina.

65 [0086] En detalle, los análisis se realizaron en HPLC Perkin-Elmer Flexar compuesta de una bomba binaria, un desgasificador de tres canales y un detector UV/VIS. El programa TotalChrome se usó para la adquisición y procesamiento de datos.

5 **[0087]** La separación se realizó en una columna de fase inversa Phenomenex Luna 5 μ l C18 (250 mm x 4,6 mm I.D.). La longitud de onda usada fue de 280 nm. El volumen de inyección fue de 20 μ l (medida del bucle). Como eluyente se usó una mezcla isocrática de formiato acetonitrilo-metanol-amonio de 30 mM (pH 2,8) 150:180:670. El caudal fue de 0,8 ml/min. La identificación de los componentes se realizó añadiendo muestras adecuadas de "patrones", es decir, componentes individuales conocidos. La cantidad de cada "patrón", añadida a 35 μ l de muestra para ser analizada, fue de 5 μ l.

10 **[0088]** Los extractos de *C. majus* se caracterizan por las concentraciones del alcaloide principal. Dicha composición se notifica en la Tabla 1 (véase a continuación), en la que las concentraciones se expresan en ppm.

Tabla 1.

Extracto	Protopina	Quelidonina	Coptisina	Estilopina	Sanguinarina	Berberina	Quelitrina
Extracto glicólico (EG)	7,49	12,96	239,24	112,60	0,08	21,63	<0,01
Tintura madre (TM)	0,21	29,29	18,89	0,34	<0,01	0,01	<0,01

[0089] La concentración de berberina puede cambiar, sin embargo, varía de 0,01 a 22 ppm (mg/l).

15 **Análisis químico de *Copaiba***

[0090] La oleorresina de *Copaiba* es un líquido viscoso, translúcido, de un color verdoso transparente. Se caracteriza por los siguientes parámetros fisicoquímicos:
 20 Peso específico: de 0,850-0,950 g/cm³, valor de acidez: \leq 2,0, valor de peróxido: \leq 10,0 y porcentaje de β -cariofileno: (GLC) \geq 42 %.

[0091] Dado que la densidad mínima de 0,85, 1 l de *copaiba* pesa 850 g, y por lo tanto contiene una cantidad de beta-cariofileno superior o igual a $850 \times 42\% = 357$ g, o una concentración de 357.000 ppm. Dado que la concentración de beta-cariofileno en varios aceites comercialmente disponibles de *Copaiba* oscila entre aproximadamente 20 y aproximadamente 60 % y que la densidad de *Copaiba* oscila entre 0,85 y 0,95, según un cálculo análogo, la concentración de beta-cariofileno en *Copaiba* puede oscilar entre $1 \times 0,85 \times 0,2 \times 1.000 \times 1.000 = 170.000$ ppm y $1 \times 0,95 \times 0,6 \times 1.000 \times 1.000 = 570.000$ ppm.

30 **Análisis químico del aceite de *Rosa mosqueta***

[0092] El aceite de *Rosa mosqueta* se caracteriza por los parámetros fisicoquímicos dados en la Tabla 2 (véase a continuación).

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos que caracterizan el aceite de *Rosa mosqueta*

- Nombre INCI (nuevo como = 2006): aceite de semilla de rosa mosqueta
- Descripción de líquido claro de color amarillo rojizo con un ligero olor característico
- Origen: de las semillas de la planta; posteriormente refinadas, neutralizadas y estabilizadas con vitamina E natural (300 ppm)
- Gravedad específica a 20 °C: 0,925 g/ml
- Índice de refracción: 1,478
- Color (Gardner): se conforma
- Color (Iovibond): 26 Y/2,4 R
- Humedad (K.F.): 0,03 %
- Valor de yodo (Wijs): 169 g/100g
- Valor de saponificación: 191 mg de KOH/g
- Valor ácido: 0,10 mg de KOH/g
- Valor de peróxido: 1,4 meqO ₂ /g
- Insaponificables: aprox. 0,5-2,5 %
- Viscosidad a 25 °C aprox. 40-50 cps
COMPOSICIÓN de los principales ÁCIDOS GRASOS (media):
- C-16:0 - Palmítico: 2,5-5,0 %
- C-16:1 - Palmitoleico: 0,1-0,4 %
- C-17:0 -Heptadecanoico: 0,1-0,2 %
- C-18:0 - Esteárico: 1,0-5,0 %
- C-18:1 - Oleico: 13,0-19,0 %
- C-18:2 - Linoleico: 42,0-55,0 %
- C-18:3 - Linolénico: 27,0-40,0 %
- C-20:0 - Aráquico: 0,3-2,0 %
Ácidos grasos poliinsaturados totales: 77-80 %

[0093] La concentración de ácido linoleico está dentro de los límites de $1 \cdot 0,925 \cdot 0,42 \cdot 1.000 \cdot 1.000 = 388.000$ y $1 \cdot 0,925 \cdot 0,55 \cdot 1.000 \cdot 1.000 = 509.000$, expresado como ppm.

Ejemplo 2: Formulaciones

5

[0094] Se prepararon las siguientes formulaciones:

Formulación	Extracto presente de <i>Chelidonium majus</i>	Presencia de <i>Copaiba</i>	Presencia de aceite de <i>Rosa mosqueta</i>	Presencia de dimeticona
1	Tintura madre	Sí	No	Sí
2	Extracto glicólico	Sí	No	Sí
3	Tintura madre	Sí	Sí	Sí
4	Extracto glicólico	Sí	Sí	Sí
5	Tintura madre	Sí	No	No
6	Extracto glicólico	Sí	No	No
7	Tintura madre	Sí	Sí	No
8	Extracto glicólico	Sí	Sí	No

Formulación 1: Gel cosmético que contiene *Chelidonium majus*, *Copaifera officinalis* y un compuesto de silicona

10

[0095]

Agua	csp ad 100
<i>Chelidonium majus</i> (tintura madre)	10
Resina de <i>Copaifera officinalis</i>	10
Dimeticona	0,15
Carbómero	0,6
Fenoxietanol	0,50
Metilparabeno de sodio	0,20
Propilparabeno de sodio	0,15

Formulación 2: Gel cosmético que contiene *Chelidonium majus*, *Copaifera officinalis* y un compuesto de silicona

15

[0096]

Agua	csp ad 100
<i>Chelidonium majus</i> (extracto glicólico)	10
Resina de <i>Copaifera officinalis</i>	10
Dimeticona	0,15
Carbómero	0,6
Fenoxietanol	0,50
Metilparabeno de sodio	0,20
Propilparabeno de sodio	0,15

Formulación 3: Gel cosmético que contiene *Chelidonium majus*, *Copaifera officinalis*, *Rosa mosqueta* y un compuesto de silicona

20

[0097]

Agua	csp ad 100
<i>Chelidonium majus</i> (tintura madre)	10
Resina de <i>Copaifera officinalis</i>	10
Aceite de <i>Rosa mosqueta</i>	5
Dimeticona	0,15
Carbómero	0,6
Fenoxietanol	0,50
Metilparabeno de sodio	0,20
Propilparabeno de sodio	0,15

25

Formulación 4: Gel cosmético que contiene *Chelidonium majus*, *Copaifera officinalis*, *Rosa mosqueta* y un compuesto de silicona

[0098]

5

Agua	csp ad 100
<i>Chelidonium majus</i> (extracto glicólico)	10
Resina de <i>Copaifera officinalis</i>	10
Aceite de <i>Rosa mosqueta</i>	5
Dimeticona	0,15
Carbómero	0,6
Fenoxietanol	0,50
Metilparabeno de sodio	0,20
Propilparabeno de sodio	0,15

Formulación 5: Gel cosmético que contiene *Chelidonium majus* y *Copaifera officinalis*

[0099]

10

Agua	csp ad 100
<i>Chelidonium majus</i> (tintura madre)	10
Resina de <i>Copaifera officinalis</i>	10
Carbómero	0,6
Fenoxietanol	0,50
Metilparabeno de sodio	0,20
Propilparabeno de sodio	0,15

Formulación 6: Gel cosmético que contiene *Chelidonium majus* y *Copaifera officinalis*

[0100]

15

Agua	csp ad 100
<i>Chelidonium majus</i> (como extracto glicólico)	10
Resina de <i>Copaifera officinalis</i>	10
Carbómero	0,6
Fenoxietanol	0,50
Metilparabeno de sodio	0,20
Propilparabeno de sodio	0,15

Formulación 7: Gel cosmético que contiene *Chelidonium majus*, *Copaifera officinalis* y *Rosa mosqueta*

[0101]

20

Agua	csp ad 100
<i>Chelidonium majus</i> (tintura madre)	10
Resina de <i>Copaifera officinalis</i>	10
Aceite de <i>Rosa mosqueta</i>	0,10
Carbómero	0,6
Fenoxietanol	0,50
Metilparabeno de sodio	0,20
Propilparabeno de sodio	0,15

Formulación 8: Gel cosmético que contiene *Chelidonium majus*, *Copaifera officinalis* y *Rosa mosqueta*

[0102]

25

Agua	csp ad 100
<i>Chelidonium majus</i> (extracto glicólico)	10
Resina de <i>Copaifera officinalis</i>	10
Aceite de <i>Rosa mosqueta</i>	5
Carbómero	0,6
Fenoxietanol	0,50
Metilparabeno de sodio	0,20
Propilparabeno de sodio	0,15

EJEMPLO 3: BIOENSAYOS Y ENSAYOS PARA LA ACTIVIDAD ANTI-RADICALCultivos celulares y tratamientos

5 **[0103]** Los fibroblastos dérmicos humanos (FDH) se cultivaron y manipularon según las instrucciones del proveedor (ECACC, cat. 106-05a, <http://www.hpacultures.org.uk/>). Los queratinocitos humanos (QEH, queratinocitos epidérmicos humanos, ECACC) se cultivaron y manipularon según las instrucciones del proveedor (ECACC, cat. 102-05a, <http://www.hpacultures.org.uk/>).

10 **[0104]** Las células CEVUH (células endoteliales de vena umbilical humana, ECACC) se cultivaron y manipularon según las instrucciones del proveedor (ECACC, cat. 200-05n, <http://www.hpacultures.org.uk/>).

15 **[0105]** Por lo que respecta a la cuantificación de citoquinas inflamatorias en el sobrenadante celular, analizada mediante el método ELISA, la cuantificación del colágeno producido por las células FDH, la evaluación de la proliferación celular y la evaluación de la morfología celular, las células se sembraron en placas de fondo plano de 24 pocillos (Corning), se dejan adherir y luego se tratan por triplicado o con la formulación de ensayo a una concentración dada, o con un medio de control en presencia o ausencia de 100 µM de H₂O₂ o de 34 ng/ml de TGF-β1. Las condiciones bajo las cuales las células se sometieron a los tratamientos por triplicado, ya sea con la formulación de ensayo a la concentración deseada o con medios de control, se definen como "condiciones de crecimiento convencional". El volumen total de medio de cultivo por pocillo fue de 500 µl. Después de un periodo de tratamiento de 24 horas, el sobrenadante celular o las células se analizaron como se describe mejor en los párrafos "Medición de citoquinas inflamatorias en el sobrenadante celular" y "La fijación de las células será metanol".

25 **[0106]** Con respecto a los ensayos destinados a evaluar la actividad deshidrogenasa mitocondrial, las células FDH, QEH y CEVUH se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos (Sarstedt), a una densidad de 2.000 a 8.000 células por pocillo, se dejaron adherir y luego se trataron por cuadruplicado con la formulación de ensayo a la concentración deseada o con un medio de control. El volumen total del medio de cultivo por pocillo fue de 100 µl. Las formulaciones de ensayo se evaluaron a concentraciones que varían de 1 % v/v a 0,000001 % v/v en el caso de componentes individuales. Se usaron fibroblastos dérmicos humanos para analizarse en pases de cultivo III T75. 30 Los queratinocitos humanos se usaron para analizarse entre el pase de cultivo I y el pase de cultivo VI. Las células CEVUH se usaron para analizarse entre el pase de cultivo I y el pase de cultivo VI.

35 **[0107]** Después de un periodo de tratamiento de 18 o 42 horas, las células se analizaron como se describe mejor en el párrafo "Evaluación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial".

40 **[0108]** Con respecto a los ensayos destinados a evaluar la migración celular, el cultivo de fibroblastos o células CEVUH se realizó en placas de fondo plano de 96 pocillos (Sarstedt), llevando a las células hasta confluencia. La evaluación de los efectos de las formulaciones, a una concentración de 0,02 % v/v, sobre la migración de fibroblastos o células CEVUH se realizó como se describe en el párrafo "Evaluación de la modulación de migración celular".

Evaluación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial

45 **[0109]** La actividad de la deshidrogenasa mitocondrial se midió en FDH, QEH y CEVUH mediante el ensayo de formazán, usando el kit Roche Diagnostic WST-1 según las instrucciones del proveedor. Brevemente, se añadió el reactivo (10 µl por pocillo), la incubación se continuó durante otras 2 o 4 horas, y al final de este tiempo se leyó la absorbancia durante 1 segundo a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas Perkin Elmer Victor 2 Wallac.

50 **[0110]** Los resultados se dan en las Figuras 1 a 4, en las que la actividad deshidrogenasa mitocondrial expresada como porcentaje de actividad (% de actividad deshidrogenasa mitocondrial) se define como: % de actividad deshidrogenasa mitocondrial = ((absorbancia de las células tratadas - absorbancia del blanco)/(absorbancia del control - absorbancia del blanco)) x 100.

Medición de citoquinas inflamatorias en el sobrenadante celular

60 **[0111]** Se realizaron determinaciones cualitativas y cuantitativas de las citoquinas inflamatorias, ligando CD40 (CD40L), interferón-γ (INF-γ), interleucina-1α (IL-1α), interleucina-1β (IL-1β), interleucina-6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina-17 (IL-17) y factor de necrosis tumoral-α (TNF-α). Cada medición se realizó por duplicado usando un micromatriz de proteína ELISA R & D System Mosaic™ según las instrucciones del proveedor. Además, con el objetivo de obtener un modelo de correlación entre la intensidad de la señal luminosa y la concentración de citoquinas, se obtuvo una curva de calibración con 6 concentraciones para cada una de estas últimas. El análisis de los datos se realizó con el software dedicado Quansys Biosciences Q-View™ Imager.

65

Fijación de las células con metanol

[0112] Después de eliminar el sobrenadante celular, las células FDH se fijaron en metanol frío durante la noche a -20 °C.

5

Protocolo para teñir las células con rojo sirio para colágeno

[0113] Después de fijarse con metanol durante una noche, se eliminó el disolvente y las células FDH fijadas se tiñeron con 400 µl/pocillo de una solución al 0,1 % de tinción con Picro-rojo sirio (PSR) durante 4 horas. Esta solución se prepara disolviendo el reactivo, rojo directo 80 Sigma-Aldrich en una solución acuosa saturada de ácido pícrico. Después de 4 h de incubación con PSR a temperatura ambiente, las células se lavaron dos veces con 200 µl/pocillo de una solución acuosa al 0,1 % de ácido acético, y se secaron.

10

Evaluación de la proliferación celular

15

[0114] Las fotografías de las células FDH teñidas con rojo sirio en todos los pocillos de las placas se tomaron con un aumento de 100x y su número, para cada fotografía, se evaluó mediante la función de recuento de células del programa ImageJ.

20

Evaluación de la morfología celular

[0115] Además, se tomaron fotografías de las células FDH teñidas con rojo sirio en todos los pocillos de las placas a aumentos de 100x, 200x y 400x. Su morfología, color y forma fueron evaluados mediante el programa ImageJ.

25

Medición de la cantidad de colágeno producido por las células mediante la elución con rojo sirio

[0116] Las células de FDH teñidas con rojo sirio se sometieron a la elución de la tinción de una manera análoga a la notificada en "*Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2007". Brevemente, la tinción retenida dentro de las células se eluyó con 200 µl/pocillo de una solución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N por agitación en un agitador oscilante, seguido de la transferencia de muestras de la solución eluida en placas de 96 pocillos. La densidad óptica (DO) se leyó usando un lector de microplacas Wallac en absorbancia de la luz a la longitud de onda de 530 nm.

30

Evaluación de la modulación de la migración celular

35

[0117] Este ensayo se realizó para evaluar los efectos en la migración de fibroblastos de formulaciones a una concentración de 0,02 % v/v.

[0118] Una vez en la confluencia, se realizó una herida artificial en forma de cruz en la monocapa de células, usando una punta de plástico estéril en cada muestra. El medio de cultivo celular se eliminó y se reemplazó con un medio que contenía la sustancia de ensayo, con la excepción de los controles negativos.

40

[0119] Inmediatamente después de la ejecución de la herida (t = 0 h) y en varios momentos (t = 24 y 48 h) se realizaron observaciones por microscopio de contraste de fase invertida de las muestras tratadas y de los controles usando un microscopio de contraste de fase invertida (INV-2 Orma) con un aumento de 200X y 400X. Los resultados se muestran como las áreas de observación contiguas a la herida, en las que se observa la presencia de células. Un aumento en esta área en tiempos crecientes corresponde a una reducción en las dimensiones de la herida, una indicación de que las células han migrado hacia el área dentro del corte. Esta área se midió usando el programa CellProfiler [Carpenter AE *et al. Genome Biology*, 2006, 7, R100].

45

Evaluación de la actividad anti-radical

50

[0120] Con respecto a los ensayos destinados a evaluar la actividad anti-radical, se usó un ensayo químico en la que se evaluó la descomposición del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH) en ausencia o en presencia de sustancias de ensayo. Con más detalle, este radical se usa para evaluar la capacidad de las sustancias para actuar como depuradores de radicales libres. DPPH en solución tiene un color púrpura, con una absorción máxima a 517 nm, que cambia a un color amarillo incoloro cuando este radical extrae un átomo de hidrógeno de un depurador de radicales, para producir la forma reducida de DPPH-H. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos (placa de cultivo tisular, célula+ de fondo plano de 96 pocillos SARSTEDT) por cuadruplicado. A cada pocillo de la microplaca, se añadieron 500 µg de formulación y luego 5 µl de una solución de DPPH 2 mM (PM 168,18, Aldrich 2,2-di(4-terc-octilfenil)-1-picrilhidrazilo, radical libre, lote n.º MKBF7574V Cat. n.º 257621-100 mg).

55

60

[0121] Un control positivo, que consiste en 500 µg de formulación con 5 mg de ácido ascórbico, y un control negativo, que consiste en 500 µg de formulación con 5 µl de H₂O₂ a 36 volúmenes, se incluyeron en cada microplaca. 30 minutos después de la adición de DPPH, se evaluaron los colores de los controles y de la formulación, y se tomó una fotografía de la placa (Canon PowerShot A610 5.0 Mpixels); acto seguido la actividad potencial anti-radical fue evaluada visualmente.

65

Evaluación de la actividad antimicrobiana

[0122] El propilenglicol se almacenó a -20 °C hasta el día del ensayo. Antes del ensayo, los aeróbicos aislados se rasparon de viales congelados en agar tripticasa de soja y se incubaron durante la noche a 35 °C. Los aislados anaeróbicos aislados se rasparon de viales congelados en agar enriquecido con *Brucella* (que contiene 5 mg/ml de haemina, 1 µg/ml de vitamina K y 5 % de sangre de oveja lisada) y se incubaron a 35 °C en condiciones anaeróbicas durante 48 horas. Los aislados de levadura se rasparon de viales congelados en agar dextrosa Sabouraud y se incubaron durante la noche a 35 °C. Los aislados fúngicos se cultivaron en agar dextrosa de patata y se incubaron durante 7-10 días a 35 °C. Las colonias se muestrearon del medio respectivo, se resuspendieron en el medio de cultivo apropiado, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

[0123] Para los ensayos en aerobios, se usó el medio Mueller Hinton II (MHBII, BD 212322, Lote 0257287, Becton, Dickinson y Co., Sparks, MD). Para ensayos en anaerobios, se usaron el medio con *Brucella* (SBB, BD 211088, Lote 0320091; Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD) enriquecido con 5 µg/ml de haemina (H9039, lote 099K1183; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1 µg/ml de vitamina K (V3501; Lote 106K1523; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 5 % de sangre de caballo (Lote 117342-2, Cleveland Scientific). Los aislados tanto de hongos como de levaduras se analizaron en medio RPMI (SH30011.04; Lote AWA92121B; HyClone Labs, Logan, UT) tamponado con MOPS (475898; Lote D00093780; CalBiochem, La Jolla, CA) 0,165 M. El pH del medio RPMI se ajustó a 7,0 con NaOH 1 N. el medio se sometió a filtración estéril usando un filtro PES de 2 µm y se almacenó a 4 °C hasta el momento del uso.

[0124] El ensayo se realizó según los métodos descritos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (INCL). La concentración inicial de propilenglicol fue del 40 %. Las diluciones en serie del disolvente se realizaron manualmente en placas de 96 pocillos. Los pocillos ubicados en las columnas 2-12 se llenaron con 460 µl de agua estéril; luego, se añadieron 460 µl del disolvente al pocillo ubicado en la columna 2 de la placa "madre" y se mezclaron. El disolvente se diluyó luego en serie y cada una de las alícuotas debidamente diluidas se añadió a la placa relevante hasta la columna 11. La columna 12 contenía agua estéril, como control del crecimiento del microorganismo. Las placas "hija" eran placas de microdilución convencional de 96 pocillos (Costar 3795) y se llenaron con 50 µl del medio adecuado para cada microorganismo. Se añadieron 40 µl de disolvente y de las muestras obtenidas a partir de diluciones en serie preparadas en la placa "madre" a las placas "hija".

[0125] Para cada microorganismo, se preparó un inóculo convencional según los métodos de CLSI. Para los hongos y las bacterias, las colonias se muestrearon de las placas de agar y se suspendieron en MHBII (aerobios), SBB (anaerobios) o RPMI (levaduras) en un patrón de McFarland de 0,5. Para *Aspergillus niger* 624, se pusieron 0,5 ml de solución salina al 0,85 % en agar, que se había inoculado 7-10 días antes, y se preparó una suspensión de hongos en la superficie de agar. La mezcla resultante se transfirió a un tubo de ensayo estéril y se dejó reposar durante 5 minutos para depositar las partículas más pesadas. Se eliminó el sobrenadante, se colocó en otro tubo de ensayo y se centrifugó durante 15 segundos. La densidad se ajustó al patrón de turbidez McFarland 0,5. Para cada microorganismo, las diluciones se llevaron a cabo en el medio apropiado para alcanzar la concentración celular descrita en la metodología INCL. Luego se inocularon 10 µl de suspensión que contenía cada microorganismo en cada pocillo. Al final del procedimiento, los pocillos de las placas "hija" contenían 50 µl de medio, 40 µl de propilenglicol y 10 µl de inóculo. Las placas se cubrieron con una tapa. Las que contenían aerobios, hongos y levaduras se colocaron en bolsas de plástico y se incubaron a 35 °C durante aproximadamente 24-48 horas antes de la lectura. Las que contenían los anaerobios se colocaron en cámaras BD GasPak y se incubaron a 35 °C durante 46-48 horas en condiciones anaeróbicas. Las placas se visualizaron a continuación desde abajo usando un visualizador de placas. La inhibición del crecimiento se leyó y registró como la concentración más baja de disolvente que inhibe el crecimiento visible del organismo.

Análisis estadístico

[0126] Los valores de proliferación celular, producción de colágeno y producción de citoquinas inflamatorias obtenidos de experimentos se sometieron a un análisis estadístico con el programa OpenStat versión 26.03.2012 (www.statprograms4u.com). En particular, la comparación entre los valores medios se llevó a cabo usando el ensayo t Student de dos colas. Los valores de P≤0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS DE LOS BIOENSAYOS Y ACTIVIDAD ANTI-RADICAL

[0127] Los resultados del ensayo dirigido a evaluar el efecto de las formulaciones de la invención sobre la actividad deshidrogenasa mitocondrial se muestran en los gráficos que se presentan a continuación, en los que la actividad deshidrogenasa mitocondrial expresada como el porcentaje de actividad se define como:

$$\% \text{ de actividad deshidrogenasa mitocondrial} = \frac{(\text{absorbancia de las células tratadas} - \text{absorbancia del blanco})}{(\text{absorbancia del control} - \text{absorbancia del blanco})} \times 100$$

[0128] En los gráficos ilustrados en las Figs. 1-4, se notifica el % de actividad deshidrogenasa mitocondrial (eje y) frente a las concentraciones de las sustancias (eje x). Los resultados del ensayo destinado a evaluar el efecto de las formulaciones de la invención sobre la migración celular se dan en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto de cuatro formulaciones de la invención sobre la migración de células FDH a una concentración de 0,01 % p/v

Ejemplo ID	Porcentaje de área de células FDH ± D.T. a las 24 h	Porcentaje de área de células FDH ± D.T. a las 24 h
Control	32 ± 1	48 ± 4
Formulación 1	45 ± 9	71 ± 1
Formulación 2	41 ± 5	71 ± 3
Formulación 3	33 ± 1	67 ± 7
Formulación 4	36 ± 14	76 ± 11

- 5 **[0129]** El efecto del tratamiento de las formulaciones 4 y 8, durante 24 horas a las concentraciones especificadas, sobre la morfología de las células FDH teñidas para el colágeno con PSR se da en las Figs. 5-7. Estas figuras muestran los datos obtenidos de FDH cultivadas en condiciones de crecimiento convencional, en presencia de 100 μM de H_2O_2 y en presencia de 34 ng/ml de TGF- β 1, respectivamente. La morfología celular se evaluó usando un microscopio óptico con aumentos de 100x, 200x e 400x.
- 10 **[0130]** Por lo que respecta a los datos de proliferación celular y los datos, normalizados para el número de células, que se refieren a la producción de colágeno, IL-1 β e IL-6, los resultados se notifican en las Tablas 4 y 5, respectivamente.

Tabla 4. Datos relativos a la proliferación celular, producción de colágeno y la liberación de citoquinas inflamatorias obtenidos a partir de FDH para colágeno teñido con rojo sirio y sometidas a diversos tratamientos con las formulaciones 4 y 8 a las concentraciones especificadas, durante un período de 24 horas, bajo condiciones de crecimiento convencional, en presencia de 100 µM de H₂O₂ y en presencia de 34 ng/ml de TGF-β1. La proliferación celular y la producción de colágeno se expresan como el valor medio de tres experimentos ± D.T, mientras que la producción de citoquinas inflamatorias IL-1β e IL-6 se expresa como el valor medio de dos experimentos ± D.T.

Tratamiento	Condiciones convencionales						100 µM de H ₂ O ₂						34 ng/ml de TGF-β1					
	N.º de foto-células ^a ± D.T.	Abs*10 ⁶ /N.º de foto-células ^b ± D.T.	IL-1β ng/(ml*N.º de foto-células) ^c ± D.T.	IL-6 ng/(ml*N.º de foto-células) ^d ± D.T.	N.º de foto-células ^a ± D.T.	Abs*10 ⁶ /N.º de foto-células ^b ± D.T.	IL-1β ng/(ml*N.º de foto-células) ^c ± D.T.	IL-6 ng/(ml*N.º de foto-células) ^d ± D.T.	N.º de foto-células ^a ± D.T.	Abs*10 ⁶ /N.º de foto-células ^b ± D.T.	IL-1β ng/(ml*N.º de foto-células) ^c ± D.T.	IL-6 ng/(ml*N.º de foto-células) ^d ± D.T.	N.º de foto-células ^a ± D.T.	Abs*10 ⁶ /N.º de foto-células ^b ± D.T.	IL-1β ng/(ml*N.º de foto-células) ^c ± D.T.	IL-6 ng/(ml*N.º de foto-células) ^d ± D.T.		
Control (C)	186 ± 28	1720 ± 102	112 ± 1	715 ± 32	183 ± 17	1475 ± 16	142 ± 2	1295 ± 109	163 ± 4	2576 ± 122	159 ± 6	969 ± 36						
Formulación 40,1 %	210 ± 38	1142 ± 47	102 ± 10	785 ± 4	155 ± 36	2174 ± 58	107 ± 7	1265 ± 40	176 ± 16	2284 ± 272	113 ± 10	676 ± 18						
Formulación 80,1 %	199 ± 22	1206 ± 90	111 ± 1	803 ± 8	142 ± 5	2711 ± 359	120 ± 8	1219 ± 98	171 ± 23	2345 ± 23	115 ± 5	660 ± 15						

^a N.º de fotocélulas = número de células leídas por microfotografía, un parámetro que indica la proliferación celular
^b Abs*10⁻⁶/N.º de fotocélulas = absorbancia escalonada por un factor de 10⁻⁶ como una relación del número de células leídas por microfotografía, un parámetro que indica la producción de colágeno por célula
^c IL-1β ng/(ml*N.º de fotocélulas) = concentración de IL-1β expresada en ng/ml como una relación del número de células leídas por microfotografía, un parámetro que indica la producción de IL-1β por célula
^d IL-6 ng/(ml*N.º de fotocélulas) = concentración de IL-6 expresada en ng/ml como una relación del número de células leídas por microfotografía, un parámetro que indica la producción de IL-6 por célula
D.T. = desviación típica

Tabla 5. Comparación entre los valores medios para la proliferación celular, producción de colágeno y la liberación de citoquinas inflamatorias mostrados en la Tabla 4, expresados como una probabilidad (P) obtenida usando el ensayo T de Student. Los valores de probabilidad $\leq 0,05$ se muestran en **negrita**.

Tratamiento	Condiciones convencionales - valor de P vs. control				100 μM de H_2O_2 - valor de P vs. control + H_2O_2				34 ng/ml de TGF- β 1 - valor de P vs. control + TGF- β 1			
	N.º de fotocélulas ^a	Abs*10 ⁶ /N.º de fotocélulas ^b	IL-1 β ng/(ml*N.º de fotocélulas) ^c	IL-6 ng/(ml*N.º de fotocélulas) ^d	N.º de fotocélulas ^a	Abs*10 ⁶ /N.º de fotocélulas ^b	IL-1 β ng/(ml*N.º de fotocélulas) ^c	IL-6 ng/(ml*N.º de fotocélulas) ^d	N.º de fotocélulas ^a	Abs*10 ⁶ /N.º de fotocélulas ^b	IL-1 β ng/(ml*N.º de fotocélulas) ^c	IL-6 ng/(ml*N.º de fotocélulas) ^d
Control (C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control + H_2O_2	0,8816	0,0147	0,0028	0,0186	-	-	-	-	-	-	-	-
Control + TGF- β 1	0,2318	0,0007	0,0083	0,0175	-	-	-	-	-	-	-	-
Formulación 40,1 %	0,4282	0,0009	0,0032	0,0948	0,2901	P<0,0001	0,021	0,7498	0,2439	0,165	0,0307	0,0093
Formulación 80,1 %	0,5615	0,0028	0,0306	0,3597	0,016	0,004	0,0636	0,5397	0,5848	0,0322	0,0154	0,0079

^a N.º de fotocélulas = número de células leídas por microfotografía, un parámetro que indica la proliferación celular
^b Abs*10⁶/N.º de fotocélulas = absorbancia escalonada por un factor de 10⁶ como una relación del número de células leídas por microfotografía, un parámetro que indica la producción de colágeno por célula
^c IL-1 β ng/(ml*N.º de fotocélulas) = concentración de IL-1 β expresada en ng/ml como una relación del número de células leídas por microfotografía, un parámetro que indica la producción de IL-1 β por célula
^d IL-6 ng/(ml*N.º de fotocélulas) = concentración de IL-6 expresada en ng/ml como una relación del número de células leídas por microfotografía, un parámetro que indica la producción de IL-6 por célula
D.T. = desviación típica

[0131] Los resultados de los ensayos destinados a estimar la actividad anti-radical potencial de las formulaciones de la invención se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Actividad anti-radical.

Sustancia	Actividad anti-radical
Controles	
Control negativo con H ₂ O ₂	Inactiva
Control positivo con vitamina C	Activa
Formulaciones que contienen extractos de <i>C. majus</i>	
Formulación 4	Activa
Formulación 8	Activa

5

[0132] Los resultados de los ensayos destinados a estimar la actividad antimicrobiana potencial del propilenglicol se dan en la Tabla 7. Esta tabla muestra las concentraciones de propilenglicol que inhiben el crecimiento de cada uno de los microorganismos analizados expresado como porcentaje.

10

Tabla 7. Actividad antimicrobiana del propilenglicol

Microorganismo	Porcentaje de propilenglicol que inhibe el crecimiento de microorganismos
<i>Staphylococcus aureus</i> 100 (ATCC 29213) ¹	20
<i>Staphylococcus aureus</i> 2119 (EE.UU. 100 SARM) ¹	20
<i>Escherichia coli</i> 102 (ATCC 25922) ¹	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 103 (ATCC 27853) ¹	10
<i>Corynebacterium striatum</i> 5975 (ATCC 6940) ¹	20
<i>Bacteroides fragilis</i> 123 (ATCC 25285) ²	10
<i>Finogoldia magna</i> 5976 (ATCC 29328)	>40
<i>Propionibacterium acnes</i> 1286 (ATCC 11829) ²	5
<i>Candida albicans</i> 104 (ATCC 90028) ³	10/10
<i>Candida parapsilosis</i> 2323 (ATCC 22019) ³	10/10
<i>Aspergillus niger</i> 624 (ATCC 16888) ²	10
Lectura de placas a las 19 horas de incubación	
² Lectura de placas a las 46-48 horas de incubación	
³ Lectura de placas a las 24 y 48 horas de incubación	

[0133] A partir de la descripción detallada y de los ejemplos mencionados anteriormente, las ventajas que surgen de las composiciones de la presente invención son obvias. En particular, tales composiciones han demostrado ser sorprendentemente y ventajosamente muy adecuadas para su uso en los campos cosmético y farmacéutico, y en particular para su uso en el tratamiento de lesiones cutáneas caracterizadas por hiperproliferación epidérmica y daño dérmico, posiblemente asociadas con una infección microbiana.

15

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un extracto de *Chelidonium majus* y *Copaiba*.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende berberina y beta-cariofileno, en la que la relación entre la cantidad en peso de beta-cariofileno y la cantidad en peso de berberina se sitúa en el intervalo de 7.000 a 60.000.000.
- 10 3. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho extracto de *Chelidonium majus* comprende protopina, estilopina, quelidonina, sanguinarina, berberina, queleritrina y coptisina y en la que:
- la relación entre la cantidad en peso de estilopina y la cantidad total en peso de sanguinarina, queleritrina, quelidonina y protopina es superior o igual a 5;
 - 15 - la relación entre la cantidad en peso de berberina y la cantidad total en peso de sanguinarina, queleritrina, quelidonina, protopina es superior o igual a 1; y
 - la relación entre la cantidad en peso de berberina y la cantidad en peso de coptisina en el extracto de *Chelidonium majus* es superior o igual a 0,05.
- 20 4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además *Rosa mosqueta*.
5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una silicona.
- 25 6. Composición según la reivindicación 5, en la que en dicha composición la relación entre la cantidad en peso de beta-cariofileno y la cantidad en peso de compuesto de silicona se sitúa en el intervalo de 10 a 40.
7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende propilenglicol.
- 30 8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en la que dicho compuesto de silicona es dimeticona.
9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de lesiones cutáneas **caracterizadas por** hiperproliferación epidérmica y daño dérmico.
- 35 10. Composición para su uso según la reivindicación 9, en la que dichas lesiones cutáneas **caracterizadas por** hiperproliferación epidérmica y daño dérmico se seleccionan entre el grupo que consiste en acné, dermatitis, psoriasis, discromía cutánea y queratosis.
- 40 11. Composición para su uso según la reivindicación 10, en la que dichas lesiones cutáneas **caracterizadas por** hiperproliferación epidérmica y daño dérmico se seleccionan entre el grupo que consiste en acné y queratosis.

Figura 1a

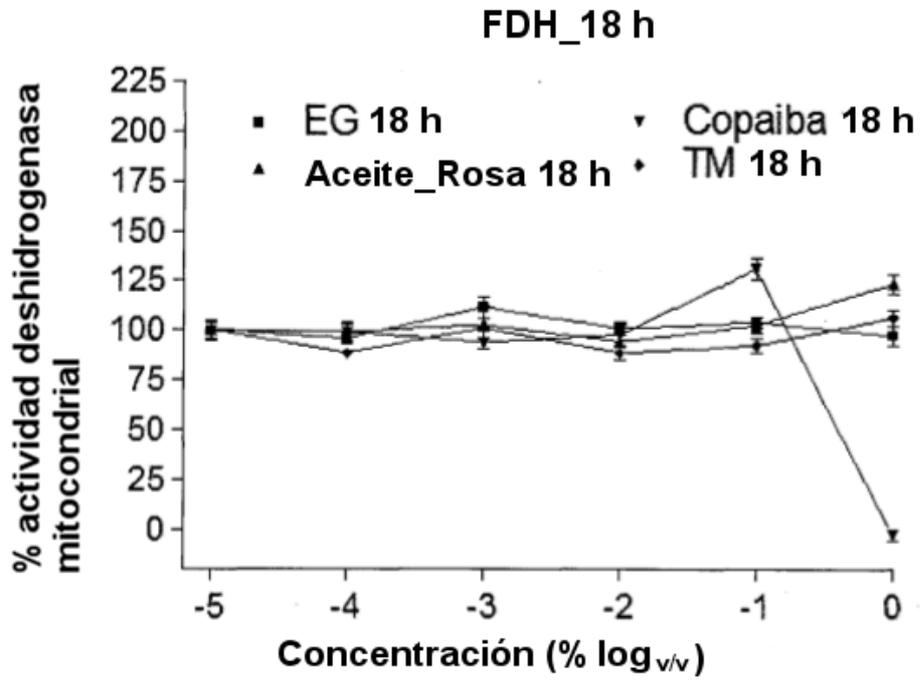


Figura 1b

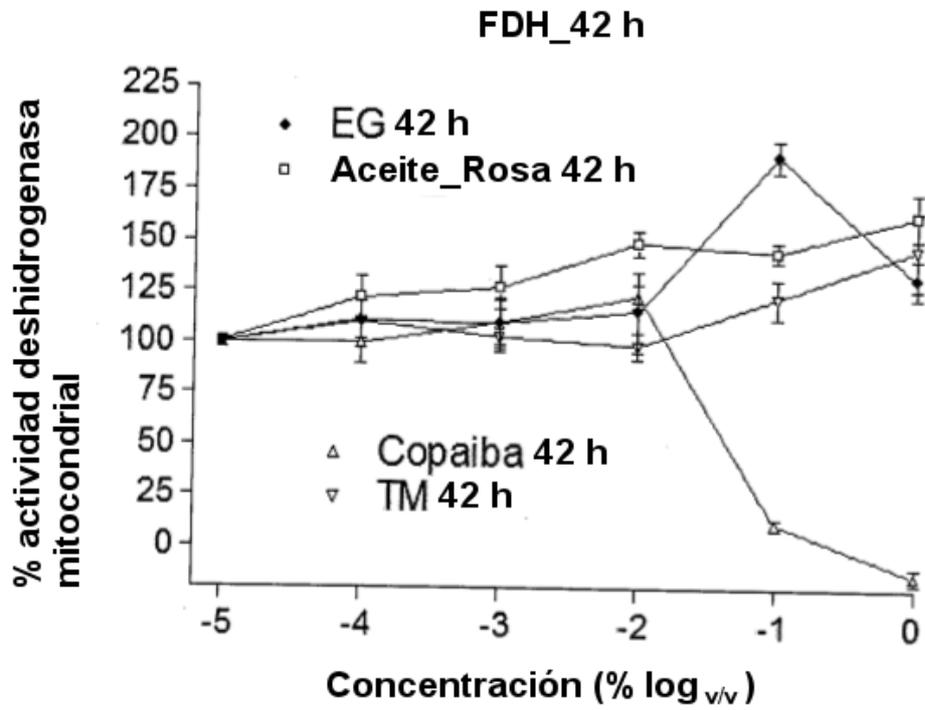


Figura 2

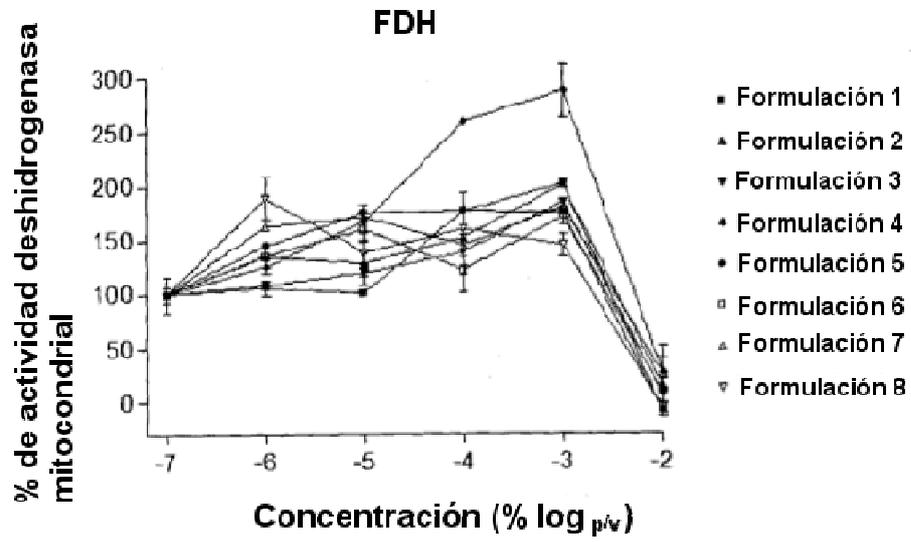


Figura 3

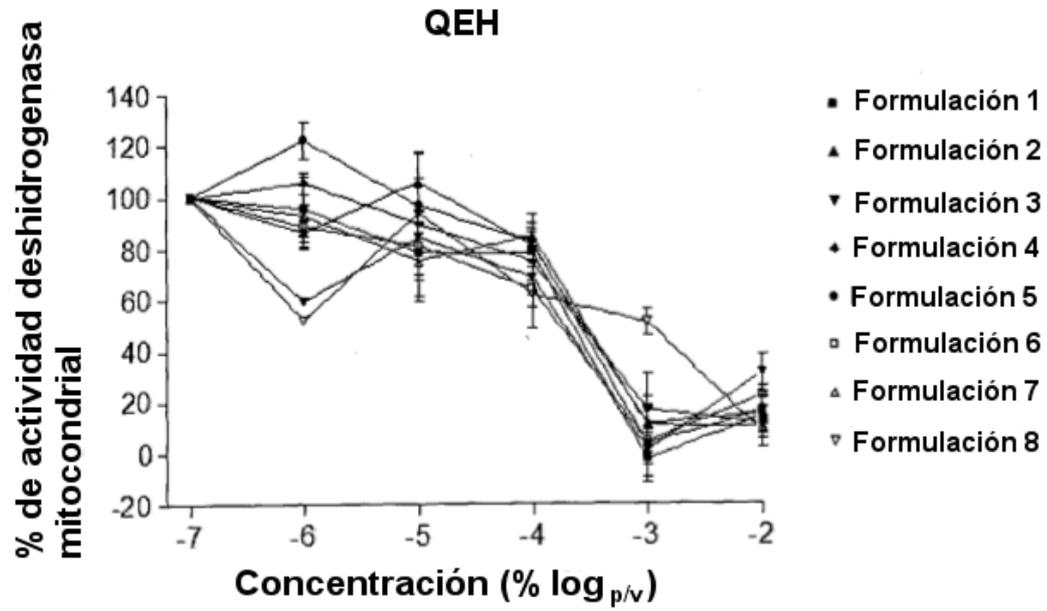


Figura 4

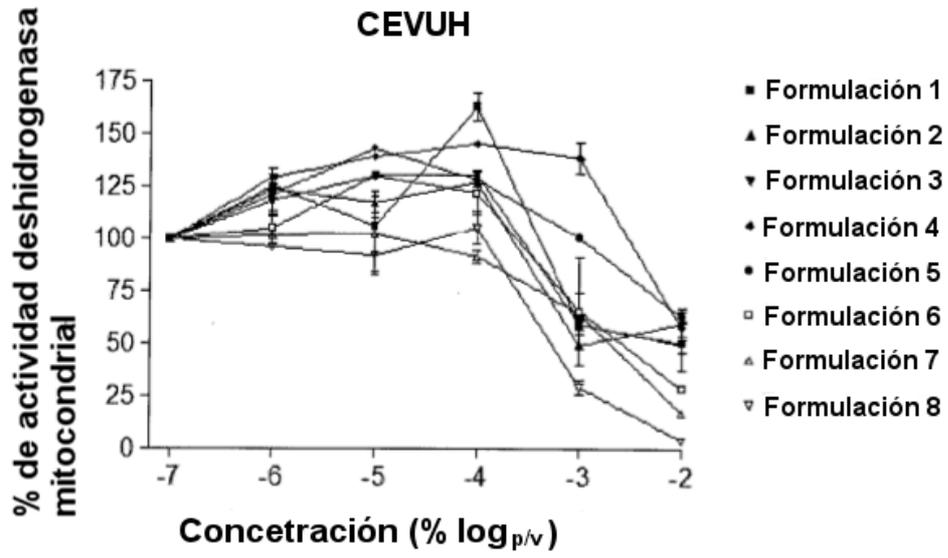


Figura 5

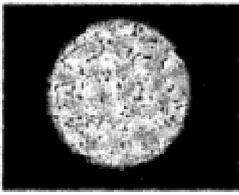
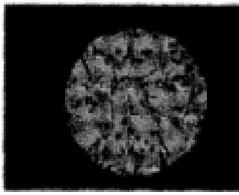
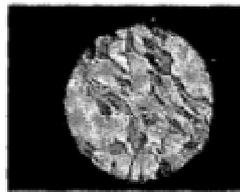
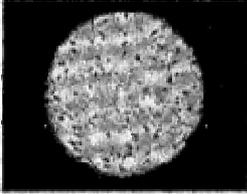
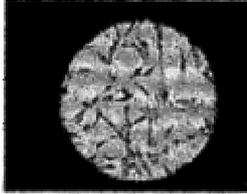
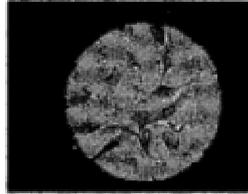
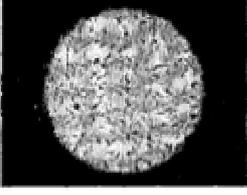
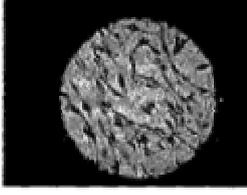
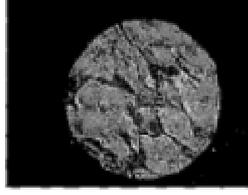
Tratamiento	Aumento		
	100x	200x	400x
Control			
Fomulación 4 0,1 %			
Fomulación 8 0,1 %			

Figura 6

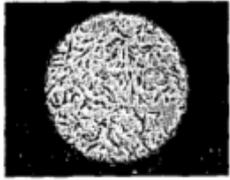
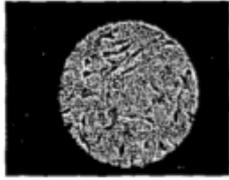
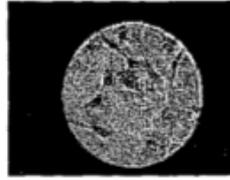
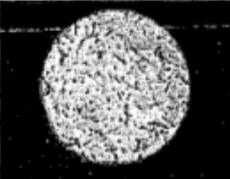
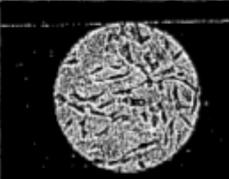
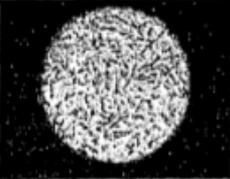
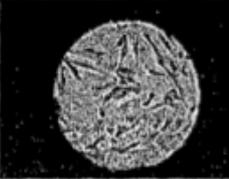
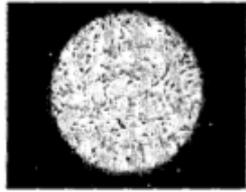
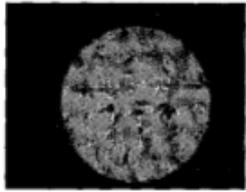
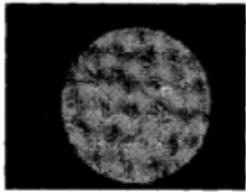
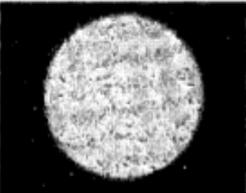
Tratamiento	Aumento		
	100x	200x	400x
100 μ M de H ₂ O ₂			
Formulación 4 0,1 % + 100 μ M de H ₂ O ₂			
Formulación 8 0,1 % + 100 μ M de H ₂ O ₂			

Figura 7

Tratamiento	Aumento		
	100x	200x	400x
34 ng/ml de TGF- β 1			
Formulación 4 0,1 % 34 ng/ml de TGF- β 1			
Formulación 8 0,1 % 34 ng/ml de TGF- β 1	