

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 495**

51 Int. Cl.:

A61K 36/315 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 47/44 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2011 E 15176576 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2974732**

54 Título: **Producto de indigo natural extraído con aceite y proceso de preparación y uso del mismo**

30 Prioridad:

18.02.2011 TW 100105463

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

12.12.2018

73 Titular/es:

**GALDERMA S.A. (100.0%)
Zugerstrasse 8
6330 Cham, CH**

72 Inventor/es:

LIN, YIN-KU

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 693 495 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

Producto de indigo natural extraído con aceite y proceso de preparación y uso del mismo

5 La presente invención se refiere a un producto de indigo natural extraído con aceite y a un proceso para preparar el mismo. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicho producto extraído con aceite.

10 La psoriasis es una enfermedad de la piel inflamatoria crónica que puede aparecer sobre la piel en cualquier área del cuerpo, en particular la cabeza, extremidades, codos, rodillas, etc. Frecuentemente se observan pápulas rojas o placas que tienen bordes claros sobre las pieles de pacientes con psoriasis, y las superficies de las lesiones de la piel de los pacientes pueden cubrirse por escamas plateadas-blancas. Algunos pacientes con psoriasis pueden incluso desarrollar artritis u otros síntomas al mismo tiempo.

15 Según los síntomas de la piel, la psoriasis se clasifica clínicamente en los cuatro tipos siguientes: psoriasis en placas crónica, psoriasis en gotas, psoriasis eritrodérmica y psoriasis pustular. La psoriasis en placas crónica, también conocida como psoriasis vulgar, es la más comúnmente observada de entre todos los tipos de psoriasis, y aproximadamente el 80 %-90 % de los pacientes con psoriasis pertenecen a este tipo. La psoriasis en gotas se caracteriza por numerosas lesiones rosas pequeñas o en forma de lágrima rojas sobre la piel de los pacientes y normalmente se produce en niños de la edad 7 a la edad 10, en los que se encuentra que la mayoría de los pacientes ha sufrido una infección estreptocócica una o dos semanas antes de la aparición de la enfermedad. La psoriasis eritrodérmica se caracteriza por la aparición de eritema o exfoliación sobre toda la superficie del cuerpo o más del 90 % de la superficie del cuerpo, y bajo afecciones más graves, la aparición de picor sobre todo el cuerpo, que puede ir adicionalmente acompañado de fiebre y malestar. Además, la psoriasis pustular aguda generalizada puede incluso inducirse en pacientes con psoriasis eritrodérmica. La psoriasis pustular puede clasificarse adicionalmente en psoriasis pustular generalizada y psoriasis pustular localizada (por ejemplo, pustulosis palmoplantar y acrodermatitis persistente). Además, aproximadamente el 10 % de los pacientes con psoriasis tienen una complicación de artritis psoriásica, que es un trastorno inflamatorio autoinmunitario conducido por linfocitos T CD8 que afecta a ligamentos, tendones, fascia y articulaciones espinales o periféricas, mientras que hasta el 90 % de los pacientes ha sufrido psoriasis ungueal.

Debido a las complicadas afecciones patológicas y síntomas implicados en ella, la patogénesis de la psoriasis tiene que ser todavía bien estudiada hasta la fecha. Algunos estudios han revelado que la herencia desempeña una función importante en la patogénesis de la psoriasis, y el traumatismo, infección, estrés, factores endocrinos, factores de metabolismo, tiempo y medicación pueden inducir o agravar la psoriasis. Después de la aparición de la psoriasis, esta enfermedad puede volver a aparecer repetidamente durante la vida de los pacientes y no es posible erradicación de la misma.

40 Los tratamientos convencionales para la psoriasis se diseñan generalmente según edad, sexo, ocupación y capacidad cognitiva del paciente, los tipos y distribución de lesiones, respuesta(s) del paciente a método(s) terapéutico(s) previo(s), y otras historias médicas del paciente. Los métodos terapéuticos primarios para la psoriasis incluyen terapia tópica, terapia sistémica, inyección de productos biológicos y fototerapia. Las composiciones para la terapia tópica incluyen, por ejemplo, corticosteroides, antralina (disponible como Margiton®), alquitrán de hulla (disponible como Polytar®), calcitriol (disponible como Silkis®), tazaroteno (disponible como Tazorac®), ácido salicílico, etc., y estas composiciones son adecuadas para tratar pacientes con psoriasis con síntomas leves. Las preparaciones orales de metotrexato (MTX), ciclosporina, retinoides, etc., se usan comúnmente para la terapia sistémica y son adecuadas para tratar pacientes con psoriasis con síntomas de medios a graves. Los productos biológicos incluyen alefacept (disponible como Amevive®), efalizumab (disponible como Raptiva®), etanercept (disponible como Enbrel®) y adalimumab (disponible como Humira®), y son aptos para inyectar en pacientes con psoriasis con síntomas de medios a graves. La fototerapia, por ejemplo, fototerapia ultravioleta B (UVB), fotoquimioterapia tal como psoraleno más ultravioleta A (PUVA), etc., es adecuada para tratar pacientes con psoriasis con síntomas graves.

55 Sin embargo, el uso a largo plazo de los tratamientos convencionales descritos anteriormente puede producir graves efectos secundarios o tolerancia a fármacos, reduciendo así adicionalmente el cumplimiento del paciente. En vista de lo anterior, muchos investigadores han intentado explorar, a partir de las medicinas tradicionales chinas (MTC), componentes activos que puedan usarse para tratar la psoriasis.

60 El índigo natural (también denominado índigo natural; chino: Quing dai) es un pigmento vegetal azul oscuro extraído de las hojas de una planta productora de índigo, tal como *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek., *Polygonum tinctorium* Lour., *Isatis indigotica* Fort., etc. El índigo natural se conoce en MTC por tener efecto de eliminación del calor y refrigerante de la sangre, y se ha usado clínicamente para tratar leucemia mieloide crónica, psoriasis, paperas, diversas úlceras (por ejemplo, úlceras pépticas, úlceras bucales, etc.), hepatitis, herpes zóster y otitis externa.

65 Se sabe que diversos componentes activos pueden aislarse del índigo natural preparado a partir de diferentes

plantas productoras de índigo, entre los que los componentes activos más comunes son índigo, indirrubina, isoíndigo, etc. Se ha informado que la indirrubina tiene efectos antitumorales, antiinflamatorios e inmunomoduladores y ha sido considerada por tener potencial en el tratamiento de leucemia mielocítica crónica (G. Eisenbrand et al. (2000), *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 130:627-635; T. Kunikata et al. (2000), *European Journal of Pharmacology*, 410:93-100; N.K. Mak et al. (2004), *Biochemical Pharmacology*, 67:167-174; S. Leclerc et al. (2001), *The Journal of Biological Chemistry*, 276:251-260).

Se ha informado que el índigo natural tiene mala solubilidad en agua y, por tanto, no pocos investigadores han pretendido extraer los componentes activos contenidos en él usando disolventes orgánicos. Q.S. Zhang et al., usaron cuatro disolventes orgánicos diferentes, es decir, 75 % de etanol, cloroformo, acetato de etilo y acetona para extraer índigo natural con/sin un tratamiento preliminar con 36 % de HCl, y se determinaron y compararon los contenidos de indirrubina de los productos así obtenidos. Los resultados experimentales obtenidos revelan que, independientemente de ser sometidos al tratamiento preliminar con 36 % de HCl_(ac) o no, el producto extraído con acetato de etilo tiene un mayor contenido de indirrubina, seguido del producto extraído con acetona, el producto extraído con cloroformo y el producto extraído con 75 % de etanol. Además, el tratamiento preliminar con 36 % de HCl_(ac) aumenta significativamente el contenido de indirrubina en cada producto extraído con disolvente orgánico (Q.S. Zhang et al. (2006), *Journal Guangxi Normal University: Natural Science Edition*, 24(3):58-60).

En estudios previos, los solicitantes desarrollaron una pomada de material compuesto de índigo natural formulada por 20 % (en peso) de polvo de índigo natural y 80 % de vehículo (que contiene 25 % de vaselina, 30 % de cera amarilla y 45 % de aceite de oliva), e investigaron el uso de dicha pomada como tratamiento tópico para la psoriasis. Los solicitantes encontraron que la administración tópica de dicha pomada fue eficaz en el tratamiento de psoriasis pediátrica, psoriasis recalcitrante y psoriasis en placas (Y. K. Lin et al. (2006a), *Pediatric Dermatology*, 23(5):507-510; Y. K. Lin et al. (2006b), *Clinical and Experimental Dermatology*, 99-100; y Y. K. Lin et al. (2007), *Dermatology*, 214:155-161).

En un estudio posterior, los solicitantes usaron una pomada de índigo natural formulada por polvo de índigo natural y el vehículo descrito anteriormente a una relación de 1:10 (en peso) para tratar pacientes ambulatorios con psoriasis en placas crónica y encontraron que la administración tópica de dicha pomada produjo reducciones significativas en las puntuaciones de descamación, eritema e induración, además del porcentaje de áreas de placas (Y. K. Lin et al. (2008), *Arch Dermatology*, 144(11):1457-1464).

Los solicitantes también investigaron el efecto antipsoriásico del índigo natural sobre la proliferación y diferenciación de queratinocitos, en los que una muestra de índigo natural, obtenida disolviendo polvo de índigo natural en sulfóxido de dimetilo (DMSO) en una proporción de 1:10 (peso/volumen), seguido de esterilización por filtración (tamaño de poro 0,2 µm), y los dos principales componentes del índigo natural es decir, el azul de índigo (adquirido en Fluka, Bucks, Suiza) y la indirrubina (adquirida en Alexis, Lausen, Suiza), ambos disueltos en DMSO antes de la dilución en medio de cultivo, se probaron en los bioensayos. Los resultados obtenidos revelan que los efectos antipsoriásicos del índigo natural están mediados, al menos en parte, modulando la proliferación y diferenciación de los queratinocitos, siendo la indirrubina el principal componente activo (Y. K. Lin et al. (2009a), *Journal of Dermatological Science*, 54:168-174).

Los solicitantes investigaron adicionalmente los efectos antiinflamatorios de dicha muestra de índigo natural y de azul de índigo e indirrubina, además de la triptatrina, en neutrófilos humanos, y encontraron que solo dicha muestra de índigo natural inhibía las respuestas proinflamatorias de neutrófilos humanos, incluyendo la explosión respiratoria y la desgranulación, que estuvieron mediadas por el bloqueo de las vías de señalización de MAPK y Ca²⁺. Los resultados obtenidos confirman el concepto de desarrollar un extracto herbal completo de índigo natural, en vez del (de los) principal(es) componente(s) contenido(s) en él, para tratar la inflamación neutrófila (Y. K. Lin et al. (2009b), *Journal of Ethnopharmacology*, 125:51-58).

Aunque se han usado disolventes orgánicos para extraer índigo natural, los productos obtenidos de esta manera, pueden contener cantidades traza de dichos disolventes orgánicos que pueden producir efectos adversos en el organismo humano. La pomada de índigo natural que han desarrollado previamente los solicitantes, tiene los inconvenientes de olor desagradable y color azul oscuro que puede dejar manchas sobre las uñas, la piel y la ropa, afectando así en el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.

Por tanto, los solicitantes desarrollaron una nueva formulación en la que el polvo de índigo natural se refina mediante una extracción con aceite de oliva, de manera que se eliminan el principal componente del índigo natural, es decir, el azul de índigo, además de impurezas, tales como cal. Esta nueva formulación reduce la alteración que causa el color azul de las uñas, la piel y la ropa y proporciona menos irritación de la piel, facilitando de esta manera el uso del tratamiento de la psoriasis.

Por tanto, según un primer aspecto, la presente invención proporciona un producto de índigo natural extraído con aceite que es obtenible por un proceso que comprende extraer el polvo de índigo natural con un aceite con calentamiento a una temperatura que oscila de 100 °C a 155 °C, seguido de un tratamiento de refinado por filtración. En un segundo aspecto, en el presente documento se desvela un proceso para preparar un producto de índigo

natural extraído con aceite que comprende someter el polvo de índigo natural a un tratamiento de extracción usando un aceite con calentamiento.

5 Se ha demostrado que el producto de indigo natural extraído con aceite es eficaz para aliviar o mejorar enfermedades psoriásicas humanas, en particular psoriasis de la piel y psoriasis ungueal. Por tanto, en un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un producto de indigo natural extraído con aceite como se ha descrito anteriormente.

10 Los objetivos, las características y las ventajas anteriores, y otros de la presente invención, serán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y a las realizaciones preferidas tomadas conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

15 la Figura 1 muestra las huellas cromatográficas de un extracto en bruto de índigo natural (panel superior) y un extracto refinado de índigo natural (panel central) como se prepara en el Ejemplo 2, más adelante, además de la huella cromatográfica de un producto extraído con DMSO de índigo natural (panel inferior) para la comparación de las mismas;

la Figura 2 muestra las fotos de referencia estándar usadas para clasificar los grados de gravedad de la psoriasis basándose en escamas, eritema e induración;

20 la Figura 3 muestra los efectos terapéuticos de una pomada en bruto de índigo natural (formulada con un producto extraído con aceite de oliva en bruto como se prepara en el Ejemplo 2, más adelante) y una pomada refinada de índigo natural (formulada con un producto extraído con aceite de oliva refinado como se prepara en el Ejemplo 2, más adelante) en el tratamiento de lesiones psoriásicas durante un periodo de 8 semanas, en la que los paneles A, B y C muestran las puntuaciones de escamas, eritema e induración como se calculan en diferentes momentos de tiempo (semana 0, 2, 4, 6 y 8), respectivamente, y el panel D muestra las sumas de estas tres puntuaciones como se calculan en diferentes momentos de tiempo (semana 0, 2, 4, 6 y 8); y todas las puntuaciones calculadas se expresan como media \pm DE;

25 la Figura 4 es un gráfico que muestra los cambios en las áreas de lesión con el tiempo producidas por las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural como se preparan en el Ejemplo 2, más adelante, en el que se representaron los valores en porcentaje promedio de las áreas de lesión con respecto a las áreas de lesión con respecto al valor del nivel inicial como se calcula en diferentes momentos de tiempo (semana 0, 2, 4, 6 y 8), y los datos se expresaron como media \pm DE; y

30 la Figura 5 es un gráfico que muestra la mejora del aspecto externo de las lesiones psoriásicas tratadas con las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural como se preparan en el Ejemplo 2, más adelante, en el que se representaron el porcentaje de las mejoras de las lesiones tratadas con respecto al nivel inicial como se calcula en diferentes momentos de tiempo (semana 0, 2, 4, 6 y 8), y los datos se expresaron como media \pm DE.

35 Debe entenderse que, si se hace referencia a cualquier publicación de la técnica anterior, dicha referencia no constituye una admisión de que la publicación forme parte del conocimiento general común en la técnica, en Taiwán o en cualquier otro país.

40 Con el fin de esta memoria descriptiva, se entenderá claramente que la palabra "que comprende" significa "que incluye pero, no se limita a", y que las palabras "comprende," "contiene" y variantes de las mismas, tienen un significado correspondiente.

45 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, que podrían usarse en la práctica de esta invención. De hecho, esta invención no está de ninguna manera limitada a los métodos y materiales descritos. Para mayor claridad, en el presente documento se usan las siguientes definiciones.

50 Como se usa en el presente documento, el término "psoriasis" o "enfermedad psoriásica" se refiere a todos los tipos de psoriasis muy conocidos para aquellos expertos en la materia. El término "psoriasis" incluye, pero no se limita a, psoriasis en placas crónica, psoriasis en gotas, psoriasis eritrodérmica, psoriasis pustular, psoriasis inversa (también conocida como psoriasis flexural), psoriasis ungueal, artritis psoriásica, etc.

55 Con el fin de desarrollar un fármaco antipsoriásico que sea seguro para uso a largo plazo, los solicitantes han intentado extraer componentes activos de índigo natural usando diferentes aceites vegetales y diversas condiciones de operación para la extracción.

60 Por consiguiente, la presente invención proporciona un producto de indigo natural extraído con aceite y un proceso para preparar el mismo. El producto de indigo natural extraído con aceite según la presente invención se obtiene extrayendo polvo de índigo natural con un aceite con calentamiento, a una temperatura que oscila de 100 °C a 155 °C y a una relación de índigo natural con respecto a aceite de oliva en un intervalo de 1:10 (p/v) a 1:40 (p/v); seguido de un tratamiento de refinado por filtración.

65 Según los resultados del análisis de HPLC, el producto de indigo natural extraído con aceite como se obtiene

después del tratamiento de extracción con aceite demostró que contenía indirrubina e índigo y presentaba un color azul-violeta. Cuando el tratamiento de refinado se realizó adicionalmente, se encontró que el producto de indigo natural extraído con aceite así obtenido tenía un contenido de indigo reducido y presentaba un color rojo púrpura.

5 En el presente documento se desvela que un aceite adecuado para su uso en la extracción del polvo de índigo natural está seleccionado del grupo que consiste en aceites vegetales, aceites animales, aceites minerales, y combinaciones de los mismos.

10 En una realización que se desvela, el aceite es un aceite vegetal seleccionado del grupo que consiste en aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de semilla de girasol, aceite de cacahuete, aceite de germen de trigo, aceite de soja, aceite de jojoba, aceite de onagra, aceite de coco, aceite de palma, aceite de almendra dulce, aceite de aloe, aceite de hueso de albaricoque, aceite de aguacate, aceite de borraja, aceite de semilla de cáñamo, aceite de nuez de macadamia, aceite de rosa mosqueta, aceite de pecana, aceite de avellana, aceite de sasanqua, aceite de salvado de arroz, manteca de karité, aceite de maíz, aceite de camelia, aceite de pepitas de uva, aceite de canola, aceite de ricino, y combinaciones de los mismos. En una realización más específica, el aceite es un aceite vegetal, seleccionado del grupo que consiste en aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de semilla de girasol, aceite de cacahuete, aceite de germen de trigo, aceite de soja y combinaciones de los mismos.

20 En la presente invención el aceite es aceite de oliva

25 Según la presente invención, la extracción con aceite del polvo de índigo natural, se realiza a una relación de índigo natural con respecto a aceite de oliva en un intervalo de 1:10 (peso/volumen) a 1:40 (peso/volumen). En una realización preferida de la presente invención, la relación de 1:10 se usa en la extracción del polvo de índigo natural por aceite de oliva.

30 Según la presente invención, la extracción con aceite del polvo de índigo natural se realiza a una temperatura que oscila de 100 °C a 155 °C. En una realización preferida de la presente invención, la extracción con aceite del polvo de índigo natural se realiza a 145 °C.

35 Según la presente invención, cuando el proceso para preparar el producto de indigo natural extraído con aceite comprende además un tratamiento de filtración para refinar el producto obtenido del tratamiento de extracción, el tratamiento de filtración puede realizarse por técnicas muy conocidas para y comúnmente usadas por aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, el tratamiento de filtración puede realizarse usando estopilla, o papel de filtro o membrana de filtro que tiene un tamaño de poro predeterminado. En una realización preferida de la presente invención, el tratamiento de filtración se realiza usando un papel de filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 6 µm. Con este tratamiento de filtración se obtiene un producto extraído con aceite refinado de índigo natural, en el que se eliminarán ampliamente el índigo e impurezas tales como la cal.

40 Los productos extraídos con aceite de índigo natural según la presente invención han demostrado tener potentes efectos terapéuticos sobre las lesiones psoriásicas en sujetos humanos, en particular lesiones psoriásicas de la piel y lesiones psoriásicas de las uñas, mientras que no causan respuestas adversas a la piel a dichos sujetos humanos. Por tanto, se espera que los productos extraídos con aceite de índigo natural según la presente invención sean útiles en el tratamiento de psoriasis. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende los productos extraídos con aceite anteriormente dichos de índigo natural

45 La composición farmacéutica según la presente invención se formula en una forma de dosificación adecuada para administración tópica o por vía oral usando tecnología muy conocida para aquellos expertos en la materia, que incluye, pero no se limita a, polvo estéril, comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas, preparaciones externas, supositorios y similares.

50 La composición farmacéutica según la presente invención puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como aquellos ampliamente empleados en la materia de la fabricación de fármacos. Por ejemplo, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir uno o más de los siguientes agentes: disolventes, emulsionantes, agentes de suspensión, descomponedores, aglutinantes, excipientes, agentes estabilizantes, agentes quelantes, diluyentes, gelificantes, conservantes, lubricantes, agentes que retrasan la absorción, liposomas y similares.

55 Preferentemente, la composición farmacéutica según la presente invención se formula en una preparación externa que puede aplicarse directamente a una lesión psoriásica. La preparación externa adecuada para la composición farmacéutica según la presente invención puede ser una emulsión, un gel, una pomada, una crema, un parche, un linimento, un aerosol, un espray, una loción, un suero, una pasta, una espuma, o una gota. En una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se formula en una preparación externa mezclando el producto de indigo natural extraído con aceite según la presente invención con una base tal como aquellas que son muy conocidas y se usan comúnmente en la materia.

60 Por ejemplo, la base adecuada para producir la preparación externa según la presente invención puede incluir uno o

más de los siguientes aditivos: hidrocarburos (por ejemplo, vaselina y vaselina filante), ceras (por ejemplo, parafina y cera amarilla), agentes conservantes, antioxidantes, tensioactivos, potenciadores de la absorción, agentes estabilizantes, gelificantes, agentes activos, absorbentes de olores, o fragancias. La elección y cantidad de estos aditivos están dentro de la experiencia de aquellos expertos en la materia.

5 En una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se formula en una pomada. En otra realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se formula en una gota de aceite.

10 La dosificación y la frecuencia de administración de la composición farmacéutica según la presente invención puede variar dependiendo de los siguientes factores: la gravedad de la enfermedad que va a tratarse, la vía de administración, y el peso, edad, condición física y respuesta del sujeto que va a tratarse. Por ejemplo, la dosificación diaria de la composición farmacéutica según la presente invención, por ejemplo, una pomada, puede ser aproximadamente 30 g para una administración a un cuerpo completo (1 g de la pomada según la presente invención puede contener 0,01-1 mg de indirrubina), y puede administrarse una vez al día o dos veces al día.

15 La composición farmacéutica según la presente invención puede usarse sola o en combinación con otras composiciones farmacéuticas, que incluyen, pero no se limitan a, corticosteroides, antralina, alquitrán de hulla, calcitriol, tazaroteno, ácido salicílico, MTX, ciclosporina, retinoides, alefacept, efalizumab, etanercept y adalimumab.

20 La presente invención se describirá adicionalmente a modo de los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que los siguientes ejemplos están únicamente previstos con el fin de ilustración y no deben interpretarse como limitantes de la invención en práctica.

Ejemplos

25 **Materiales experimentales:**

1. Se compró polvo de índigo natural que se preparó a partir de la planta de *Strobilanthes formosanus* Moore (Acanthaceae) cultivada en las montañas cerca del distrito de Sansia, Ciudad de Nuevo Taipéi, Taiwán, de Guang Sheng Trading (Taipéi, Taiwán).
2. Todos los aceites vegetales usados en extraer el polvo de índigo natural se adquirieron en Sigma (EE.UU.).

Procedimientos experimentales generales:

35 1. Análisis cuantitativos de indirrubina en productos extraídos de índigo natural por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):

Como se sabe que la indirrubina es uno de los principales componentes activos del índigo natural en los siguientes ejemplos se usó como indicador para determinar las influencias de diferentes condiciones de operación tras la extracción, en particular extracción con aceite, de polvo de índigo natural

40 Para determinar el contenido de indirrubina del mismo, un producto extraído de índigo natural como se prepara en los siguientes ejemplos se sometió a un análisis de HPLC usando un sistema de cromatografía de líquidos serie 1100 de Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) bajo las condiciones de operación mostradas en la Tabla 1, en el que se usó indirrubina (adquirida en Alexis, Lausen, Suiza; 0,1 mg/ml en cloroformo) como patrón de control.

Tabla 1. Condiciones de operación de HPLC para el análisis cuantitativo de indirrubina.

Columna	Agilent ZORBAX SIL
Longitud de onda de detección	UV-307 nm
Fase móvil	Cloroformo/acetato de etilo (80:20, v/v)
Condiciones para la elución en gradiente	Mantener el contenido de acetato de etilo al 20 % durante 0-12 minutos; aumentar el contenido de acetato de etilo del 20 % al 100 % durante 12-15 minutos; mantener el contenido de acetato de etilo al 100 % durante 15-25 minutos; y reducir el contenido de acetato de etilo del 100 % al 20 % durante 25-30 minutos.
Velocidad de flujo (ml/minuto)	1

50 **Ejemplo 1. Influencias de las condiciones de extracción sobre el contenido de indirrubina en los productos extraídos con aceite de índigo natural**

A. Influencias de los diferentes aceites de extracción sobre el contenido de indirrubina en los productos extraídos con aceite de índigo natural

55 En este experimento, los solicitantes probaron siete aceites vegetales, que incluyen, aceite de oliva, aceite de

semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de semilla de girasol, aceite de cacahuete, aceite de germen de trigo y aceite de soja, para determinar su capacidad de extracción de polvo de índigo natural. De estos experimentos, el experimento con aceite de oliva es de acuerdo con la invención. En resumen, de manera uniforme se mezclaron 2 ml de cada aceite con 0,1 g de polvo de índigo natural y la mezcla resultante se calentó a 110 °C durante 30 minutos. Los siete productos extraídos con aceite en bruto así obtenidos, que presentaron todos un color azul-violeta, se filtraron utilizando un filtro de jeringa (Millipore, Francia), respectivamente, y los filtrados así recogidos formaron los productos correspondiente extraídos con aceite refinados de color rojo púrpura. Para la comparación, se prepararon dos productos extraídos con disolvente orgánico realizando los mismos experimentos de extracción usando dos disolventes orgánicos diferentes, concretamente acetato de etilo y etanol.

Cien µl de cada uno de los productos extraídos de índigo natural, como se ha descrito anteriormente, se diluyeron 10 veces con cloroformo y a continuación se sometieron a análisis de HPLC como se expone en la sección titulada "1. Análisis cuantitativo de indirrubina en productos extraídos de índigo natural por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)," de los Procedimientos experimentales generales, de manera que se determinara el contenido de indirrubina de los mismos.

Resultados:

La Tabla 2 muestra los contenidos de indirrubina en productos extraídos de índigo natural como se preparan a partir de diferentes disolventes de extracción. Puede observarse de la Tabla 2 que los siete productos extraídos con aceite refinados de índigo natural tienen cada uno un contenido de indirrubina entre aquellos de los productos extraídos con acetato de etilo y etanol de índigo natural. Además, de entre los siete productos extraídos con aceite refinados de índigo natural el producto extraído con aceite de sésamo tiene el mayor contenido de indirrubina, seguido del producto extraído con aceite de oliva. Sin embargo, el aceite de sésamo tiene una composición complicada de componentes, además de un olor fuerte y, según algunos informes, puede inducir alergia en algunas personas. Por tanto, el solicitante supuso que el producto extraído con aceite de oliva de índigo natural podría ser más adecuado para uso clínico en términos de seguridad y entonces se usó este producto para realizar los posteriores experimentos de la presente invención.

Tabla 2. Contenidos de indirrubina en productos extraídos de índigo natural como se preparan a partir de diferentes disolventes de extracción.

Disolvente de extracción		Contenido de indirrubina en producto extraído de índigo natural (mg/g)
Aceite vegetal	Aceite de oliva	1,78
	Aceite de semilla de algodón	1,30
	Aceite de sésamo	1,85
	Aceite de semilla de girasol	1,36
	Aceite de cacahuete	1,56
	Aceite de germen de trigo	1,26
	Aceite de soja	1,39
Disolvente orgánico	Acetato de etilo	2,37
	Etanol	1,19

B. La influencia de las temperaturas de calentamiento sobre el contenido de indirrubina en productos extraídos con aceite de oliva de índigo natural.

Se mezcló uniformemente 1 g del polvo de índigo natural con 10 ml de aceite de oliva, y la mezcla resultante se calentó a una temperatura designada (100 °C, 110 °C, 125 °C, 145 °C y 155 °C) durante 30 minutos, seguido de pasar a través de un filtro de jeringa. Los 100 µl del filtrado así recogidos se diluyeron 10 veces con cloroformo y a continuación se sometieron a análisis de HPLC como se expone en la sección titulada "1. Análisis cuantitativo de indirrubina en productos extraídos de índigo natural por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)," de los Procedimientos experimentales generales, de manera que se determinara el contenido de indirrubina de los mismos.

Resultados:

La Tabla 3 muestra los contenidos de indirrubina en productos extraídos con aceite de oliva de índigo natural como se preparan a diferentes temperaturas de calentamiento. Puede observarse de la Tabla 3 que la indirrubina puede extraerse de índigo natural a diferentes temperaturas de calentamiento, obteniéndose el mayor contenido de indirrubina a 145 °C. Los solicitantes usaron entonces 145 °C como temperatura de calentamiento en los posteriores experimentos.

Tabla 3. Contenidos de indirrubina en productos extraídos con aceite de oliva de índigo natural como se preparan a

diferentes temperaturas de calentamiento.

Temperatura de calentamiento (°C)	Contenido de indirrubina en producto extraído con aceite de oliva de índigo natural (mg/g)
100	3,22
110	3,42
125	4,18
145	4,66
155	4,3

C. Selección de la relación de polvo de índigo natural con respecto a aceite de oliva

5 Se mezcló uniformemente el polvo de índigo natural a una cantidad designada (1 g, 0,5 g y 0,25 g) con 10 ml de aceite de oliva de manera que se proporcionara una mezcla que tenía una relación de índigo natural con respecto a aceite de oliva a 1:10, 1:20 o 1:40 (peso/volumen). La mezcla se calentó a 100 °C durante 30 minutos, seguido de pasar a través de un filtro de jeringa. Los 100 µl del filtrado así recogidos se diluyeron 10 veces con cloroformo y a
10 continuación se sometieron a análisis de HPLC como se expone en la sección titulada "1. Análisis cuantitativo de indirrubina en productos extraídos de índigo natural por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)", de los Procedimientos experimentales generales, de manera que se determinara el contenido de indirrubina de los mismos.

Resultados:

15 Los contenidos de indirrubina en productos extraídos con aceite de oliva de índigo natural como se preparan a diferentes relaciones de índigo natural con respecto a aceite de oliva (1:10, 1:20 y 1:40, peso/volumen) se muestran en la Tabla 4. Los solicitantes encontraron que no estaba presente diferencia significativa entre los contenidos de indirrubina de los tres productos extraídos con aceite de oliva de índigo natural así obtenidos. Además, bajo una
20 cantidad fija de polvo de índigo natural un aumento de la cantidad de aceite de oliva usada dejó de aumentar significativamente el contenido de indirrubina en el producto extraído con aceite de oliva de índigo natural sino que produjo una dilución de los componentes activos contenidos en el producto extraído. Así, para obtener económicamente un producto extraído con aceite de oliva de índigo natural que tiene una concentración saturada de indirrubina, los solicitantes decidieron seleccionar la relación de 1:10 en la extracción del polvo de índigo natural por
25 aceite de oliva.

Tabla 4. Contenidos de indirrubina en productos extraídos con aceite de oliva de índigo natural como se preparan a diferentes relaciones de índigo natural con respecto a aceite de oliva.

Relación de índigo natural con respecto a aceite de oliva (peso/volumen)	Contenido de indirrubina en producto extraído con aceite de oliva de índigo natural (mg/g)
1 : 10	3,2
1 : 20	3,44
1 : 40	3,48

30 Basándose en los resultados experimentales obtenidos en las secciones A-C precedentes, se determinaron las condiciones de extracción con aceite preferidas para índigo natural y se exponen brevemente en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de operación preferidas para la extracción con aceite de índigo natural

Disolvente de aceite	Aceite de oliva
Temperatura de calentamiento	145 °C
Tiempo de extracción	30 minutos
Relación de índigo natural con respecto a aceite de oliva (peso/volumen)	1:10

Ejemplo 2. Preparación a gran escala del producto extraído con aceite de oliva de índigo natural según la presente invención

35 Siguiendo las condiciones de operación mostradas en la Tabla 5, se mezclaron 90 g del polvo de índigo natural con 900 ml de aceite de oliva en un recipiente de acero inoxidable, seguido de calentamiento a 145 °C durante 30 minutos, de forma que se obtuvo un extracto en bruto de índigo natural que tenía un color azul-violeta. Se repitió el
40 mismo tratamiento de extracción del polvo de índigo natural para proporcionar un segundo extracto en bruto de índigo natural que se filtró adicionalmente a través de un papel de filtro que tenía un tamaño de poro de 6 µm, proporcionando así un extracto refinado de índigo natural que tenía un color rojo púrpura. Los extractos en bruto y refinados de índigo natural así obtenidos se usaron en los siguientes experimentos.

45 Para verificar la distribución de los principales componentes de los mismos, tanto los extractos en bruto como

refinados de índigo natural como se preparan anteriormente se sometieron a análisis de HPLC como se expone en la sección titulada "1. Análisis cuantitativo de indirrubina en productos extraídos de índigo natural por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)", de los Procedimientos experimentales generales. Para la comparación, también se analizó un producto extraído con DMSO de índigo natural que se preparó como se ha descrito previamente (Y K. Lin et al. (2009a) y Y K. Lin et al. (2009b), arriba).

Con referencia a la Figura 1, puede observarse que tanto los extractos en bruto (panel superior) como refinados (panel central) de índigo natural tienen una huella cromatográfica diferente de la del producto extraído con DMSO de índigo natural (panel inferior). Además, en comparación con el extracto en bruto de índigo natural, el contenido de índigo en el extracto refinado de índigo natural se redujo significativamente.

Ejemplo 3. Evaluaciones del efecto terapéutico, seguridad y conveniencia de pomadas de índigo natural formuladas según la presente invención en el tratamiento de psoriasis de la piel humana

Con el fin de examinar el efecto terapéutico, la seguridad y la conveniencia de los extractos en bruto y refinados de índigo natural como se preparan en el Ejemplo 2 anterior en el tratamiento de psoriasis de la piel humana, se realizaron las siguientes pruebas.

A. Preparación de pomadas de índigo natural en bruto y refinadas

Se mezclaron 900 ml de cada uno de los extractos en bruto y refinados de índigo natural como se preparan en el Ejemplo 2 anterior con 90 g de cera amarilla y 90 g de vaselina, de manera que se obtuvieron una pomada en bruto que contenía el extracto en bruto de índigo natural y una pomada refinada que contenía el extracto refinado de índigo natural respectivamente.

B. Cribado de sujetos de prueba e información clínica de los mismos

Se inscribieron sujetos de prueba que participaban en las siguientes pruebas preclínicas del departamento ambulatorio de medicina china del Hospital Memorial Chang Gung, Taiwán. Se requirió que estos sujetos de prueba cumplieran todos los criterios de inclusión y de exclusión que se exponen brevemente en la Tabla 6. Las pruebas fueron autorizadas por el Comité de ética médica del Hospital Memorial Chang Gung, y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada uno de los sujetos de prueba.

Tabla 6. Criterios de inclusión y de exclusión usados para cribar sujetos de prueba.

Criterios de inclusión	1	El sujeto fue diagnosticado con psoriasis en placas por un dermatólogo.
	2	El sujeto tuvo un área de la lesión psoriásica total de no más del 60 % del área superficial de piel total del cuerpo.
	3	El sujeto tuvo al menos dos lesiones con grados similares de gravedad en el cuerpo del mismo.
	4	El sujeto tenía buena condición de salud y no tenía anomalía en la función hepática y renal, además de hematología.
	5	El sujeto era un hombre o una mujer de edad entre 20 y 75 años.
	6	Si el sujeto era una mujer en edad de procrear, aceptó usar anticoncepción durante la prueba.
Criterios de exclusión	1	El sujeto tenía una historia de alergia a al menos uno de los componentes de la composición farmacéutica de prueba.
	2	El sujeto había recibido una fototerapia o una terapia usando un fármaco antipsoriásico sistémico (tal como retinoides, ciclosporina, MTX, etc.) en el plazo de 4 semanas antes de la prueba.
	3	El sujeto había recibido una terapia usando un fármaco antipsoriásico local (tal como alquitrán de hulla, corticosteroides, análogos de vitamina D ₃ , etc.) en el plazo de 2 semanas antes del experimento.
	4	El sujeto tenía una historia médica de psoriasis no en placas (es decir, pustular o eritrodérmica) o psoriasis inducida por fármaco.
	5	El sujeto tenía enfermedad mental, diabetes, enfermedad hepática o renal, cáncer o SIDA.
	6	El sujeto femenino tenía que dar de mamar, estaba embarazada o se estaba preparando para el embarazo.
	7	El sujeto no estuvo disponible para la evaluación en los momentos de tiempo designados durante la prueba.

Un total de 38 sujetos de prueba participaron en la siguiente prueba preclínica, y la información clínica de los

mismos, que incluye sexo, edad, duración de la psoriasis, área de psoriasis e índice de gravedad (PASI) y el porcentaje de área superficial del cuerpo implicada en la psoriasis, se exponen brevemente en la Tabla 7.

Tabla 7. Información clínica de 38 sujetos de prueba inscritos en la prueba preclínica.

		Media ± DE	Intervalo
Sexo	Masculino (total)	31	-
	Femenino (total)	7	-
Edad (años)		42,8 ± 12,7	23~63
Duración de la psoriasis (año)		12,2 ± 10,5	1~45
PASI		11,5 ± 7,8	1,6~36,1
Porcentaje de área superficial del cuerpo implicada en la psoriasis (%)		19,0 ± 14,7	2~60

5

C. Prueba pre-clínica

10 Antes del inicio de la prueba (es decir, en la semana 0), se seleccionaron dos lesiones con grado de gravedad similar del cuerpo (excluyendo la cabeza y el cuello) de cada uno de los 38 sujetos de prueba inscritos y después se fotografiaron por separado y se sometieron a medición del área de lesión, expresándose los datos obtenidos como cm².

15 Las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural como se preparan en la sección A precedente se aplicaron a las dos lesiones seleccionadas de cada sujeto de prueba una vez al día a una dosis de 1 g/100 cm² del área de lesión durante un periodo de ocho semanas, respectivamente. A finales de las semanas 2, 4, 6 y 8, las lesiones tratadas se fotografiaron por separado y se sometieron a medición del área de lesión. Para determinar el efecto terapéutico, la seguridad y conveniencia de las dos pomadas probadas, las lesiones tratadas se evaluaron según los métodos expuestos en las secciones D y E a continuación.

20 Durante el tiempo de prueba, tres sujetos de prueba masculinos dejaron de completar el tratamiento con pomada, en los que el primero se retiró de la prueba en la semana 4 debido al trabajo, el segundo se retiró debido al desarrollo de una afección pruriginosa en las áreas tratadas en la semana 5, y el tercero se retiró en la semana 6 debido a mudanza. Así, solo 35 sujetos de prueba completaron satisfactoriamente la prueba preclínica.

25 D. Evaluación del efecto terapéutico

1. Evaluación de los grados de gravedad de la psoriasis basándose en escamas, eritema e induración:

30 Las fotos de las lesiones seleccionadas de los sujetos de prueba como se obtuvieron en la semana 0 (es decir, antes de la aplicación de las pomadas de prueba de índigo natural) y a finales de las semanas 2, 4, 6 y 8 después de empezar la aplicación de las pomadas de prueba de índigo natural se compararon con las fotos de referencia estándar como se muestra en la Figura 2 por un dermatólogo. Basándose en dichas fotos de referencia estándar, los grados de escamas, eritema e induración se clasificaron con una puntuación que oscilaba de 0 a 4, respectivamente, en la que 0 = normal, 1 = leves, 2 = moderadas, 3 = graves y 4 = muy graves. Entonces se determinó el efecto terapéutico de una pomada de prueba basándose en las puntuaciones de escamas, eritema e induración, respectivamente, calculadas en los momentos de tiempo designados (semana 0, 2, 4, 6 y 8), además de las sumas de dichas tres puntuaciones calculadas.

40 Los datos experimentales así obtenidos para todas las lesiones seleccionadas de los sujetos de prueba se expresaron como media ± DE y se representaron frente al tiempo. Se usó la prueba de la t para datos emparejados o la prueba del orden con signo de Wilcoxon para comparar las puntuaciones de escamas, eritema e induración entre las dos lesiones, cuando corresponda. También se realizó la prueba de la t para datos emparejados, con objeto de comparar las puntuaciones de escamas, eritema e induración entre los pre- y post-tratamientos. Se usó el modelo del efecto mixto para explicar la dependencia del tiempo de la medición repetida y las diferencias entre las dos lesiones. La significación estadística se indicó mediante el valor de p <0,05.

2. Evaluación del cambio en el área de lesión:

50 Las áreas de lesión de las lesiones seleccionadas de los sujetos de prueba como se miden en la semana 0 (es decir, antes de la aplicación de las pomadas de prueba de índigo natural) y a finales de las semanas 2, 4, 6 y 8 después de empezar la aplicación de las pomadas de prueba de índigo natural se introdujeron en la siguiente ecuación (1) para determinar los cambios en las áreas de lesiones con el tiempo producidas por las pomadas de prueba.

$$C = (B/A) \times 100 \quad (1)$$

55 en la que:

- A = el valor de un área de lesión (expresada como cm²) medida en la semana 0 (es decir, el valor del nivel inicial).
 B = el valor del área de lesión (expresada como cm²) medida en un momento de tiempo designado (semana 0, 2, 4, 6 y 8); y
 C = el porcentaje del valor del área de lesión con respecto al valor del nivel inicial en el momento de tiempo designado.

Los datos experimentales así obtenidos para todas las lesiones seleccionadas de los sujetos de prueba se expresaron como media ± DE y se representaron frente al tiempo y se analizaron estadísticamente como se ha descrito anteriormente.

3. Evaluación de la mejora del aspecto externo de la lesión psoriásica:

Para determinar el efecto de mejora de cada pomada de prueba de índigo natural sobre el aspecto externo de la lesión psoriásica, el valor de la suma de las puntuaciones de escamas, eritema e induración como se ha calculado para una lesión seleccionada en un momento de tiempo designado (semana 0, 2, 4, 6 y 8) en la subsección 1 precedente se multiplicó por el valor en porcentaje correspondiente del área de lesión con respecto al valor del nivel inicial en el momento de tiempo designado como se ha obtenido en la subsección 2 precedente, de forma que se obtuvo una "puntuación de área y gravedad" para dicha lesión seleccionada en el momento de tiempo designado. Las puntuaciones de área y gravedad así calculadas para todas las lesiones seleccionadas de los sujetos de prueba se introdujeron posteriormente en la siguiente ecuación (2):

$$F = [(D - E) / D] \times 100 \quad (2)$$

en la que:

- D = la puntuación de área y gravedad calculada para una lesión seleccionada en la semana 0 (es decir, el valor del nivel inicial);
 E = la puntuación de área y gravedad calculada para la lesión seleccionada en un momento de tiempo designado (semana 2, 4, 6 y 8); y
 F = el porcentaje de mejora de la lesión seleccionada con respecto al nivel inicial en el momento de tiempo designado.

Los datos experimentales así obtenidos para todas las lesiones seleccionadas de los sujetos de prueba se expresaron como media ± DE y se representaron frente al tiempo y se analizaron estadísticamente como se ha descrito anteriormente.

4. Evaluación global de la mejora de la lesión psoriásica:

Para evaluar la mejora global proporcionada por cada pomada de prueba de índigo natural las fotos de las lesiones seleccionadas que se han obtenido al final de la semana 8 para los 35 sujetos de prueba que completaron la prueba preclínica se compararon visualmente por un dermatólogo con las fotos correspondientes obtenidas en la semana 0. El grado de mejora, es decir, el cambio observado de la lesión mostrada en la foto obtenida al final de la semana 8 en comparación con la mostrada en la foto correspondiente obtenida en la semana 0, se clasificó con una puntuación que oscilaba de 0 a 5, en la que 0 = peor, 1 = sin cambio, 2 = ligeramente mejorada, 3 = moderadamente mejorada, 4 = casi desaparecida y 5 = desaparecida. Mientras tanto, se indicó a cada uno de los sujetos de prueba que proporcionara una auto-evaluación global observando visualmente las lesiones seleccionadas y clasificando las mismas basándose en el método de puntuación anterior.

Según la evaluación global del dermatólogo y las autoevaluaciones globales de los sujetos de prueba, se contaron los números de sujetos de prueba que tenían las mismas puntuaciones de clasificación, respectivamente, seguido del cálculo de los porcentajes de dichos números de sujetos de prueba con respecto al número total de sujetos de prueba. Los datos así obtenidos se analizaron usando la prueba de McNemar de manera que se determinará la correlación entre los resultados experimentales del grupo que utiliza de pomada en bruto y los del grupo que utiliza pomada refinada.

E. Evaluación de la seguridad y conveniencia

La evaluación de la seguridad la realizó un investigador a finales de las semanas 2, 4, 6 y 8 después de empezar la aplicación de las pomadas de prueba de índigo natural. El investigador preguntó a los sujetos de prueba respecto a la aparición de cualquier respuesta adversa de la piel (incluyendo picor, irritación y eritema), y los resultados se registraron según las siguientes puntuaciones de clasificación: 0 = nada, 1 = leves, 2 = moderadas y 3 = graves. La conveniencia de las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural se evaluó según la respuesta de cada uno de los sujetos de prueba al final de la prueba preclínica.

Resultados:

A. Evaluación de los efectos terapéuticos de las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural

La Figura 3 muestra los efectos terapéuticos de las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural como se preparan en el Ejemplo 2 anterior. Puede observarse de los resultados mostrados en los paneles A, B, C y D de la Figura 3 que las puntuaciones de escamas, eritema e induración se redujeron significativamente con el tiempo debido al tratamiento con pomada, respectivamente, en comparación con las puntuaciones correspondientes calculadas en la semana 0. Además, no se encontró que existiera diferencia significativa entre el grupo que utilizaba la pomada en bruto y el grupo que utilizaba la pomada refinada en el mismo momento.

La Figura 4 muestra los cambios en las área de lesión con el tiempo, producidos por las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural tal y como se preparan en el Ejemplo 2 anterior, y la Figura 5 muestra la mejora del aspecto externo de lesiones psoriásicas tratadas con las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural como se preparan en el Ejemplo 2 anterior. Puede observarse de la Figura 4 y Figura 5 que los valores en porcentaje promedio de las áreas de lesión con respecto al valor del nivel inicial se redujeron significativamente con el tiempo debido al tratamiento con pomada, mientras que las mejoras en porcentaje de las lesiones tratadas con respecto al nivel inicial aumentaron significativamente con el tiempo debido al tratamiento con pomada, en comparación con los datos correspondientes obtenidos en la semana 0. Además, no se encontró que existiera diferencia significativa entre el grupo que utilizaba la pomada en bruto y el grupo que utilizaba la pomada refinada en el mismo momento.

Los resultados experimentales anteriores revelan que tanto las pomadas en bruto como las refinadas de índigo natural, según la presente invención, son eficaces para aliviar lesiones psoriásicas y que no hay diferencia significativa en la eficacia terapéutica.

Adicionalmente, un dermatólogo evaluó las mejoras globales de las lesiones psoriásicas, como proporcionan las pomadas de prueba de índigo natural, y los 35 sujetos de prueba, que completaron la prueba preclínica al final de la prueba así como los resultados obtenidos, se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Mejoras globales de lesiones psoriásicas evaluadas por un dermatólogo y por los sujetos de prueba.

	Evaluación de los sujetos de prueba		Evaluación del dermatólogo	
	Pomada refinada	Pomada en bruto	Pomada refinada	Pomada en bruto
Desaparecidas (5 ^a)	12 ^b (34,3 % ^c)	8 (22,9 %)	19 (54,3 %)	18(51,4 %)
Casi desaparecidas (4)	11 (31,4 %)	13 (37,1 %)	3 (8,6 %)	3 (8,6 %)
Moderadamente mejoradas (3)	9 (25,7 %)	11 (31,4 %)	6 (17,1 %)	6 (17,1 %)
Ligeramente mejoradas (2)	1 (2,9 %)	1 (2,9 %)	3 (8,6 %)	3 (8,6 %)
Sin cambio (1)	1 (2,9 %)	1 (2,9 %)	1 (2,9 %)	2 (5,7 %)
Peor (0)	1 (2,9 %)	1 (2,9 %)	3 (8,6 %)	3 (8,6 %)
Correlación	0,70		0,83	
^a : Una puntuación de clasificación como se indica. ^b : El número de sujetos de prueba que tienen una puntuación de clasificación como se indica. ^c : El porcentaje de dicho número de sujetos de prueba con respecto al número total de sujetos de prueba.				

En la Tabla 8 puede observarse que no solo el dermatólogo, sino también la mayoría de los sujetos de prueba, consideraron que las pomadas en bruto y las refinadas de índigo natural, según la presente invención, eran eficaces para aliviar lesiones psoriásicas y que presentaban efectos terapéuticos similares.

B. Evaluación de la seguridad y conveniencia de las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural

La Tabla 9 muestra los resultados de la evaluación de seguridad de las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural como se preparan en el Ejemplo 2 anterior. Puede observarse de la Tabla 9 que entre los sujetos de prueba que completaron la prueba, solo algunos de ellos experimentaron respuestas de la piel adversas temporales y leves, que incluyen picor, irritación y eritema, que, sin embargo, no les detuvieron para completar la prueba. Particularmente, se encontró que la pomada en bruto de índigo natural tenía una mayor puntuación en comparación con la pomada refinada de índigo natural que indica que el extracto de aceite de oliva en bruto de índigo natural podría refinarse por filtración para eliminar cualquier posible impureza y pigmento no deseado contenido en su interior, reduciéndose así la incidencia de producirse una o más respuestas adversas de la piel.

Tabla 9. Resultados de la evaluación de seguridad de las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural

		Respuesta adversa de la piel			Puntuación total
		Picor	Irritación	Eritema	
Pomada en bruto	Semana 2	1 ^a x6 ^b , 2x1	-	1x1, 2x1	32
	Semana 4	1x5	1x1	1x2	
	Semana 6	1x4	1x1	1x2	
	Semana 8	1x5	-	1x1	
Pomada refinada	Semana 2	1x5	1x1	-	17
	Semana 4	1x1	1x2	-	
	Semana 6	1x4	1x2	1x1	
	Semana 8	1x1	-	-	

^a: Una puntuación de clasificación indicada para evaluar el grado de una respuesta adversa de la piel.
^b: El número de sujetos de prueba que tienen la puntuación de clasificación que se indica.

5 Al final de la prueba preclínica, las ventajas de las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural se evaluaron según las respuestas de los 35 sujetos de prueba que completaron la prueba, de entre los que 31 sujetos de prueba (88,6 %) respondieron que la pomada refinada de índigo natural era más fácil de usar que la pomada en bruto de índigo natural 3 sujetos de prueba (8,6 %) informaron que no hubo diferencia entre las pomadas en bruto y refinadas de índigo natural y solo 1 sujeto de prueba (2,9 %) informó que la pomada en bruto de índigo natural era mejor que la pomada refinada de índigo natural. Los solicitantes llegaron entonces a la conclusión de que sería menos probable que el producto extraído con aceite de oliva refinado de índigo natural que se obtuvo sometiendo el producto extraído con aceite de oliva en bruto de índigo natural a un tratamiento de refinado por filtración y, por tanto, tuvo relativamente menos impurezas y un color relativamente claro, indujera reacción (reacciones) adversa(s) de la piel o produjera un cambio de color de la piel o ropas, haciendo así la pomada refinada de índigo natural más fácil de usar y aumentando el cumplimiento del paciente en el uso de la misma.

15 **Ejemplo 4. Evaluaciones del efecto terapéutico y la seguridad de gota de aceite de índigo natural en el tratamiento de psoriasis ungueal humana**

20 Con el fin de examinar el efecto terapéutico y la seguridad del extracto refinado de índigo natural como se prepara en el Ejemplo 2 anterior en el tratamiento de psoriasis ungueal humana, se realizaron las siguientes pruebas.

A. Preparación de gota de aceite de índigo natural y gota de aceite de oliva

25 Se dispensó el extracto refinado de índigo natural como se prepara en el Ejemplo 2 anterior en frascos cuentagotas para servir de la gota de aceite de índigo natural probada a continuación. Mientras tanto, se dispensó aceite de oliva en frascos cuentagotas para servir de la gota de aceite de oliva probada a continuación.

B. Cribado de sujetos de prueba e información clínica de los mismos

30 Se inscribieron sujetos de prueba que participaban en las siguientes pruebas preclínicas del departamento ambulatorio de medicina china del Hospital Memorial Chang Gung, Taiwán. Se requirió que estos sujetos de prueba cumplieran todos los criterios de inclusión y de exclusión expuestos brevemente en la Tabla 10. Las pruebas fueron autorizadas por el Comité de ética médica del Hospital Memorial Chang Gung, y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada uno de los sujetos de prueba.

Tabla 10. Criterios de inclusión y de exclusión usados para cribar sujetos de prueba.

Criterios de inclusión	1	El sujeto fue diagnosticado por un dermatólogo que tenía psoriasis ungueal, individualmente o en combinación con psoriasis de la piel.
	2	El sujeto tenía buena condición de salud y no tenía anomalía en la función hepática y renal, además de hematología.
	3	El sujeto era un hombre o una mujer de edad entre 20 y 65 años.
	4	Si el sujeto era una mujer en edad de procrear, aceptó usar anticoncepción durante la prueba.
Criterios de exclusión	1	El sujeto tenía una historia de alergia a índigo natural
	2	El sujeto había recibido una terapia usando un fármaco antipsoriásico tal como retinoides, ciclosporina, MTX, etc., o una terapia de inyección de producto biológico.

3	El sujeto femenino tenía que dar de mamar, estaba embarazada o se estaba preparando para el embarazo.
4	El sujeto no estuvo disponible para la evaluación en los momentos de tiempo designados durante la prueba.

Un total de 31 sujetos de prueba participaron en la siguiente prueba preclínica, y la información clínica de los mismos, que incluye sexo, edad, duración de la psoriasis, PASI, etc., se expone brevemente en la Tabla 11.

5 Tabla 11. Información clínica de 31 sujetos de prueba inscritos en la prueba preclínica.

		Media ± DE	Intervalo
Sexo	Masculino (total)	24	-
	Femenino (total)	7	-
Edad (años)		40,7 ± 12,6	21~65
Duración de la psoriasis de la piel (año)		9,4 ± 6,6	0~22
Duración de la psoriasis ungueal (año)		5,2 ± 5,5	0,5~21
Historia familiar de psoriasis		7	-
Artritis psoriásica		8	-
PASI		9,0 ± 8,6	0~42,6
Porcentaje de área superficial del cuerpo implicada en la psoriasis (%)		15,3 ± 19,9	0~99
Número de dedos que tienen psoriasis ungueal		9,4 ± 1,1	5~10

C. Prueba pre-clínica

10 Las manos derecha e izquierda de cada uno de los sujetos de prueba se dividieron aleatoriamente en el grupo experimental y el grupo de control, y se fotografiaron las lesiones psoriásicas de las uñas. Se les indicó a los sujetos de prueba que aplicaran la gota de aceite de índigo natural sobre la placa ungueal, pliegue ungueal e hiponiquio de las uñas afectadas a una dosis de 0,05~0,1 ml por uña dos veces al día (por la mañana y en el momento de acostarse), y también se les indicó que no se lavaran las uñas en el plazo de al menos 30 minutos después de la aplicación, además de evitar cualquier actividad que pudiera producir lesión a las uñas. El tiempo de prueba para el grupo experimental duró durante un periodo de 24 semanas en conjunto.

Mientras tanto, las uñas en el grupo de control se aplicaron con la gota de aceite de oliva de la misma forma que se ha descrito anteriormente para el grupo experimental durante un periodo de 12 semanas, y luego se aplicaron con la gota de aceite de índigo natural durante otro periodo de 12 semanas.

20 A finales de las semanas 4, 8, 12, 16, 20 y 24 durante el tiempo de prueba, las uñas en el grupo experimental y aquellas en el grupo de control de cada sujeto de prueba se fotografiaron por separado y luego se evaluaron según los métodos expuestos en las secciones D y E a continuación.

25 Durante el tiempo de prueba, 4 sujetos de prueba se retiraron de la prueba en la semana 8, 16, 20 y 24, respectivamente, por fallo en aplicar la gota de aceite como se ha había indicado. Así, solo 27 sujetos de prueba completaron satisfactoriamente la prueba preclínica.

D. Evaluación del efecto terapéutico

30 1. Evaluación de la psoriasis ungueal por el índice de gravedad de la psoriasis ungueal (NAPSI):

35 Las fotos de las uñas en el grupo experimental y aquellas en el grupo de control como se obtuvieron en la semana 0 (es decir, antes de la aplicación de la gota de aceite de prueba) y a finales de las semanas 4, 8, 12, 16, 20 y 24 después de empezar la aplicación de la gota de aceite de prueba se sometieron a una evaluación de NAPSI según las reglas establecidas en la Tabla 1 de P. Rich y R. K. Scher (2003), J. Am. Acad. Dermatol., 49(2):206-212, en la que las características clínicas usadas en la evaluación de NAPSI se exponen brevemente en la Tabla 12, de manera que se calculan las puntuaciones de NAPSI totales, además de las puntuaciones de NAPSI individuales de dichas características clínicas, de las uñas en el grupo experimental y aquellas en el grupo de control en los momentos de tiempo designados (semanas 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24). Las puntuaciones de NAPSI individuales como se han calculado basándose en las fotos de las uñas obtenidas al final de la semana 12 se compararon con las calculadas basándose en las fotos de uñas obtenidas en la semana 0, de manera que se determinara el (los) efecto(s) de mejora de la gota de aceite de índigo natural sobre las características clínicas de las uñas de los sujetos de prueba.

45

Los datos experimentales así obtenidos se expresaron como media ± DE, y se analizaron estadísticamente usando un modelo de efectos mixtos, seguido de la prueba de Bonferroni, de manera que se determinaran la(s) diferencia(s) entre diferentes momentos de tiempo para un grupo de prueba, y la(s) diferencia(s) entre el grupo experimental y el grupo de control en el mismo momento de tiempo. La significancia estadística se indicó por $p < 0,05$.

5

Tabla 12. Características clínicas usadas en la evaluación de NAPSI de psoriasis ungueal.

	Características clínicas
Psoriasis de la matriz de la uña	Lesiones punteadas
	Leuconiquia
	Manchas rojas en la lúnula
	Desmoronamiento de la placa ungueal
	Onicólisis
Psoriasis del lecho de la uña	Hemorragias con astillamiento
	Hiperqueratosis subungueal
	Alteración de color del lecho ungueal

2. Evaluación de la psoriasis ungueal por un NAPSI objetivo modificado:

10 Para cada sujeto de prueba, una uña objetivo que se consideró que tenía la mayor gravedad de enfermedad se seleccionó respectivamente de los cinco dedos mostrados en las fotos del grupo experimental y el grupo de control obtenidos en la semana 0, y dicha uña objetivo se sometió entonces a una evaluación de NAPSI objetivo modificado según las reglas informadas en C.A. Parrish et al. (2005), J. Am. Acad. Dermatol., 53 (4):745-746, usando las características clínicas brevemente expuestas en la Tabla 12, de manera que se calculara la puntuación de NAPSI objetivo modificada total de dicha uña objetivo en los momentos de tiempo designados (semanas 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24).

15

Los datos experimentales así obtenidos se expresaron como media ± DE y se analizaron estadísticamente como se ha descrito anteriormente para la evaluación de NAPSI.

20

3. Evaluación de la mejora de la psoriasis ungueal:

Para determinar el efecto de mejora de la gota de aceite de índigo natural sobre la psoriasis ungueal, las puntuaciones de NAPSI totales o las puntuaciones de NAPSI objetivo modificadas totales calculadas para cada sujeto de prueba se introdujeron en la siguiente ecuación (3):

25

$$J = [(G-H)/G] \times 100 \quad (3)$$

en la que:

30

G = la puntuación de NAPSI total o la puntuación de NAPSI objetivo modificada total calculadas para un grupo de prueba en la semana 0 (es decir, el valor del nivel inicial);

H = la puntuación de NAPSI total o la puntuación de NAPSI objetivo modificada total calculadas para el grupo de prueba en un momento de tiempo designado (semana 12 y 24); y

35

J = el porcentaje de mejora de psoriasis ungueal con respecto al nivel inicial en el momento de tiempo designado.

Los datos experimentales así obtenidos se expresaron como media ± DE y se analizaron estadísticamente como se ha descrito anteriormente para la evaluación de NAPSI.

40

4. Evaluación global de la mejora de la psoriasis ungueal:

Para evaluar la mejora global proporcionada por la gota de aceite de índigo natural las fotos de uñas que se habían obtenido a finales de las semanas 12 y 24 para los sujetos de prueba se compararon visualmente por un dermatólogo con las fotos correspondientes obtenidas en la semana 0, en las que el grado de mejora, es decir, el cambio observado de las uñas mostradas en las fotos obtenidas al final de las semanas 12 o 24 en comparación con las mostradas en las fotos correspondientes obtenidas en la semana 0, se clasificó con una puntuación que oscilaba de 0 a 5, en la que 0 = peor, 1 = sin cambio, 2 = ligeramente mejorada, 3 = moderadamente mejorada, 4 = casi desaparecida y 5 = desaparecida. Mientras tanto, se indicó a cada uno de los sujetos de prueba que proporcionara una auto-evaluación global observando visualmente sus propias uñas y clasificando las mismas basándose en el método de puntuación anterior.

50

Según la evaluación global del dermatólogo y las autoevaluaciones globales de los sujetos de prueba, se contaron los números de sujetos de prueba que tenían las mismas puntuaciones de clasificación, respectivamente, seguido de calcular los porcentajes de dichos números de sujetos de prueba con respecto al número total de sujetos de prueba.

5

E. Evaluación de seguridad

La evaluación de la seguridad se realizó por un investigador a finales de las semanas 4, 8, 12, 16, 20 y 24 después de empezar la aplicación de la gota de aceite de índigo natural. El investigador preguntó a los sujetos de prueba respecto a la aparición de cualquier respuesta adversa de la piel (incluyendo picor, irritación y eritema), y los resultados se registraron según las siguientes puntuaciones de clasificación: 0 = nada, 1 = leves, 2 = moderadas y 3 = graves.

10

Resultados:

15

A. Evaluación del efecto terapéutico de la gota de aceite de índigo natural

La Tabla 13 muestra los cambios de las puntuaciones de NAPSI totales, las puntuaciones de NAPSI objetivo modificadas totales y las mejoras en el porcentaje de la psoriasis ungueal de las uñas en los grupos experimental y de control con el tiempo. Puede observarse de la Tabla 13 que durante el primer periodo de 12 semanas, la aplicación de la gota de aceite de índigo natural produjo una reducción de las puntuaciones de NAPSI totales y las puntuaciones de NAPSI objetivo modificadas totales de las uñas con el tiempo, y se encontró una mejora significativa de la psoriasis ungueal en el grupo experimental en comparación con el grupo de control al final de la semana 12. Durante el segundo periodo de 12 semanas, las puntuaciones de NAPSI totales y las puntuaciones de NAPSI objetivo modificadas totales se redujeron con el tiempo en tanto los grupos experimentales como de control. Además, se encontró una mejora significativa de la psoriasis ungueal en tanto los grupos experimentales como de control al final de la semana 24.

20

25

Tabla 13. La evaluación del efecto terapéutico de la gota de aceite de indigo natural por la puntuación de NAPSÍ y la puntuación de NAPSÍ objetivo modificada.

Grupo	Tiempo de detección	Número de sujetos de prueba	Puntuación de NAPSÍ		Puntuación de NAPSÍ objetivo modificada	
			Puntuación de NAPSÍ total (media \pm DE)	Mejora en el porcentaje de la psoriasis ungueal	Puntuación de NAPSÍ objetivo modificada (media \pm DE)	Mejora en el porcentaje de la psoriasis ungueal
EXP.	Semana 0	31	21,3 \pm 8,2	-	13,5 \pm 5,7	-
	Semana 4	31	17,0 \pm 7,7	-	9,8 \pm 5,1**	-
	Semana 8	30	15,1 \pm 6,8 ** #	-	7,3 \pm 4,9 ** #	-
	Semana 12	30	12,1 \pm 10,8 *** #	49,2#	5,5 \pm 3,2 *** #	56,9 #
	Semana 16	29	11,5 \pm 6,8 **	-	5,9 \pm 3,7 **	-
	Semana 20	28	10,3 \pm 7,1 **	-	5,4 \pm 4,5 **	-
	Semana 24	27	8,3 \pm 6,0* *	61,1	2,9 \pm 2,2 **	77,5#
	Semana 0	31	20,1 \pm 8,6	-	12,4 \pm 5,1	-
Control	Semana 4	31	18,6 \pm 7,5	-	10,2 \pm 4,0	-
	Semana 8	30	17,3 \pm 6,8	-	10,3 \pm 4,9	-
	Semana 12	30	15,5 \pm 5,8	19,8	10,3 \pm 4,8	13,9
	Semana 16	29	13,1 \pm 6,2 **	-	6,8 \pm 3,3**	-
	Semana 16	28	11,1 \pm 6,1* *	-	6,0 \pm 4,1**	-
	Semana 24	27	8,7 \pm 5,5* *	56,6	4,5 \pm 3,2**	58,9

** : cuando los datos experimentales obtenidos en un momento de tiempo designado se compararon con los obtenidos en la semana 0 en el mismo grupo de prueba, p < 0,01;
 # : cuando los datos experimentales del grupo experimental se compararon con los del grupo de control como se ha obtenido en el mismo momento de tiempo, p < 0,05; y
 - : no determinado.

Para los 30 sujetos de prueba que completaron la prueba preclínica durante el primer periodo de 12 semanas, sus uñas se sometieron a la evaluación de NAPSI basándose en las características clínicas de la psoriasis ungueal como se ha expuesto brevemente en la Tabla 12, y los resultados experimentales así obtenidos se resumen en la Tabla 14.

Puede observarse de la Tabla 14 que las lesiones punteadas tienen la mayor incidencia entre las cuatro características clínicas de la psoriasis de la matriz ungueal, seguido de desmoronamiento de la placa ungueal, mientras que la onicólisis tiene la mayor incidencia entre las cuatro características clínicas de la psoriasis del lecho ungueal, seguido de alteración de color del lecho ungueal e hiperqueratosis subungueal. Además, no se observó la característica clínica de manchas rojas en la lúnula para ningún sujeto de prueba.

En general, las puntuaciones de NAPSI individuales de las uñas en el grupo experimental como se calculan al final de la semana 12 fueron inferiores a aquellas calculadas al final de la semana 0. Además, en comparación con el grupo de control, las características clínicas de la psoriasis ungueal, en particular la alteración de color del lecho ungueal, onicólisis y lesiones punteadas, de las uñas en el grupo experimental mejoraron significativamente al final de la semana 12. Los resultados experimentales mostrados en la Tabla 14 revelan que la gota de aceite de índigo natural es eficaz en mejorar las características clínicas de la psoriasis ungueal, en particular la alteración de color del lecho ungueal, onicólisis y lesiones punteadas.

Tabla 14. Las puntuaciones de NAPSI individuales de las uñas en los grupos experimentales y de control calculadas al final de la semana 12 basándose en las características clínicas de psoriasis ungueal.

Característica clínica		Grupo	Número de uñas	Puntuación de NAPSI (media ± DE)	
				Semana 0	Semana 12
Psoriasis de la matriz ungueal	Lesiones punteadas	EXP	69 ^a	2,51 ± 1,12 ^b	1,10 ± 1,33**
		Control	63	2,54 ± 1,13	1,79 ± 1,50
	Leuconiquia	EXP	3	1,33 ± 0,58	0
		Control	1	2,00	0
	Manchas rojas en la lúnula	EXP	0	0	0
		Control	0	0	0
Desmoronamiento de la placa ungueal	EXP	50	2,94 ± 1,20	1,02 ± 1,35	
	Control	54	2,89 ± 1,16	1,24 ± 1,59	
Psoriasis del lecho ungueal	Onicólisis	EXP	126	1,96 ± 0,65	0,63 ± 0,86**
		Control	119	1,93 ± 0,59	1,33 ± 2,21
	Hemorragias con astillamiento	EXP	28	1,39 ± 0,79	0,50 ± 0,69
		Control	21	1,33 ± 0,80	0,52 ± 0,68
	Hiperqueratosis subungueal	EXP	50	2,76 ± 0,98	1,02 ± 1,08
		Control	49	2,71 ± 0,96	1,36 ± 1,16
Alteración de color del lecho ungueal	EXP	55	2,07 ± 1,14	0,27 ± 0,60**	
	Control	49	1,92 ± 1,00	0,98 ± 0,96	

^a: El número de uñas que presentaron un característica clínica específica como se indica.
^b: La puntuación de NAPSI individual calculada basándose en una característica clínica específica como se indica.
^{**}: Cuando los datos experimentales obtenidos al final de la semana 12 se compararon con los del grupo de control obtenidos al final de la semana 12, p < 0,01.

Las mejoras globales de la psoriasis ungueal, proporcionadas por la gota de aceite de índigo natural, se evaluaron adicionalmente por un dermatólogo y por los sujetos de prueba al final de las semanas 12 y 24, y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15. Mejoras globales de la psoriasis ungueal evaluadas por un dermatólogo y por los sujetos de prueba.

	Evaluación por sujetos de prueba				Evaluación por dermatólogo			
	Semana 12		Semana 24		Semana 12		Semana 24	
	Control	EXP	Control	EXP	Control	EXP	Control	EXP
Desaparecidas (5 ^a)	0 ^b (0 % ^c)	0 (0 %)	2 (7,4 %)	3 (11,1 %)	0 (0 %)	1 (3,3 %)	4 (14,8 %)	7 (25,9 %)
Casi desaparecidas (4)	1 (3,3 %)	5 (16,7 %)	7 (25,9 %)	11 (40,7 %)	1 (3,3 %)	8 (26,7 %)	3 (11,1 %)	8 (29,6 %)

Moderadamente mejoradas (3)	4 (13,3 %)	11 (36,7 %)	9 (33,3 %)	7 (25,9 %)	4 (13,3 %)	9 (30,0 %)	10 (37,0 %)	5 (18,5 %)
Ligeramente mejoradas (2)	6 (20 %)	8 (26,7 %)	6 (22,2 %)	4 (14,8 %)	5 (16,7 %)	8 (26,7 %)	5 (18,5 %)	5 (18,5 %)
Sin cambio (1)	7 (23,3 %)	4 (13,3 %)	2 (7,4 %)	1 (3,7 %)	11 (36,7 %)	2 (6,7 %)	3 (11,1 %)	0 (0 %)
Peor (0)	12 (40 %)	2 (6,7 %)	1 (3,7 %)	1 (3,7 %)	9 (30,0 %)	2 (6,7 %)	2 (7,4 %)	2 (7,4 %)
<p>^a: Una puntuación de clasificación como se indica.</p> <p>^b: El número de sujetos de prueba que tiene una puntuación de clasificación como se indica.</p> <p>^c: El porcentaje de dicho número de sujetos de prueba con respecto al número total de sujetos de prueba.</p>								

5 Puede observarse de la Tabla 15 que no solo el dermatólogo, sino también la mayoría de los sujetos de prueba, consideraron que la gota de aceite de índigo natural según la presente invención era eficaz en aliviar lesiones ungueales psoriásicas. En particular, la mayoría de los sujetos de prueba consideraron que sus uñas afectadas habían mejorado significativamente al final de la semana 24 en comparación con la mejora global evaluada al final de la semana 12.

B. Evaluación de la seguridad de la gota de aceite de índigo natural

10 Durante el tiempo de prueba, no se observó respuesta adversa de la piel para todas las uñas aplicadas con la gota de aceite de índigo natural (datos no mostrados).

15 En vista de lo anterior, los solicitantes contemplan que el producto extraído con aceite de oliva de índigo natural según la presente invención puede desarrollarse en un fármaco antipsoriásico para uso a largo plazo en el tratamiento de enfermedades psoriásicas, en particular psoriasis de la piel y psoriasis ungueal.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un producto de índigo natural extraído con aceite que es obtenible por un proceso que comprende extraer polvo de índigo natural con aceite de oliva con calentamiento a una temperatura que oscila entre 100 °C y 155 °C, y a una relación de índigo natural con respecto a aceite de oliva en un intervalo de 1:10 (p/v) a 1:40 (p/v); seguido de un tratamiento de refinado por filtración.
- 10 2. El producto de índigo natural extraído con aceite según la reivindicación 1, en el que la relación de índigo natural con respecto a aceite de oliva es de 1:10 (p/v).
3. El producto de índigo natural extraído con aceite según las reivindicaciones 1 o 2 que comprende indirrubina.
- 15 4. Una composición farmacéutica que comprende un producto de índigo natural extraído con aceite según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que está formulada en una forma de dosificación para administración tópica u oral.
5. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la forma de dosificación para administración tópica se selecciona de una emulsión, un gel, una pomada, una crema, un parche, un linimento, un aerosol, un spray, una loción, un suero, una pasta, una espuma o una gota.
- 20 6. Una composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que la forma de dosificación es una pomada o una gota de aceite.
7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que la pomada comprende uno o más de los siguientes aditivos:
- 25 - Una cera, y
- Vaselina.
- 30 8. Un producto de índigo natural extraído con aceite como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento de la psoriasis.
9. Una composición farmacéutica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, para su uso en el tratamiento de la psoriasis.
- 35 10. Una composición farmacéutica para uso de la reivindicación 9 para un uso combinado con otra composición farmacéutica que incluye un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: corticosteroides, antralina, alquitrán de hulla, calcitriol, tazaroteno, ácido salicílico, metotrexato (MTX), ciclosporina, retinoides, alefacept, efalizumab, etanercept y adalimumab.

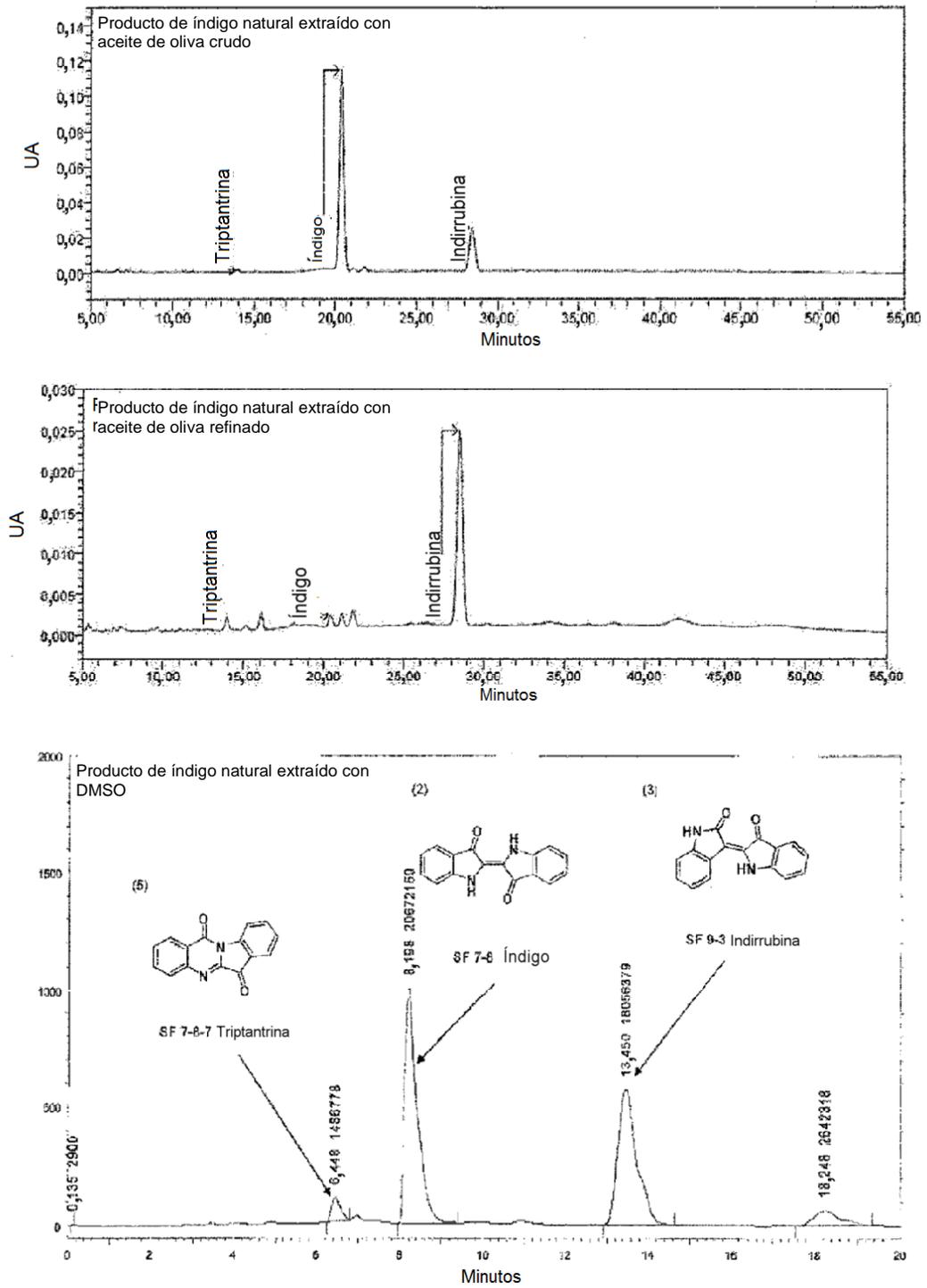


FIG. 1

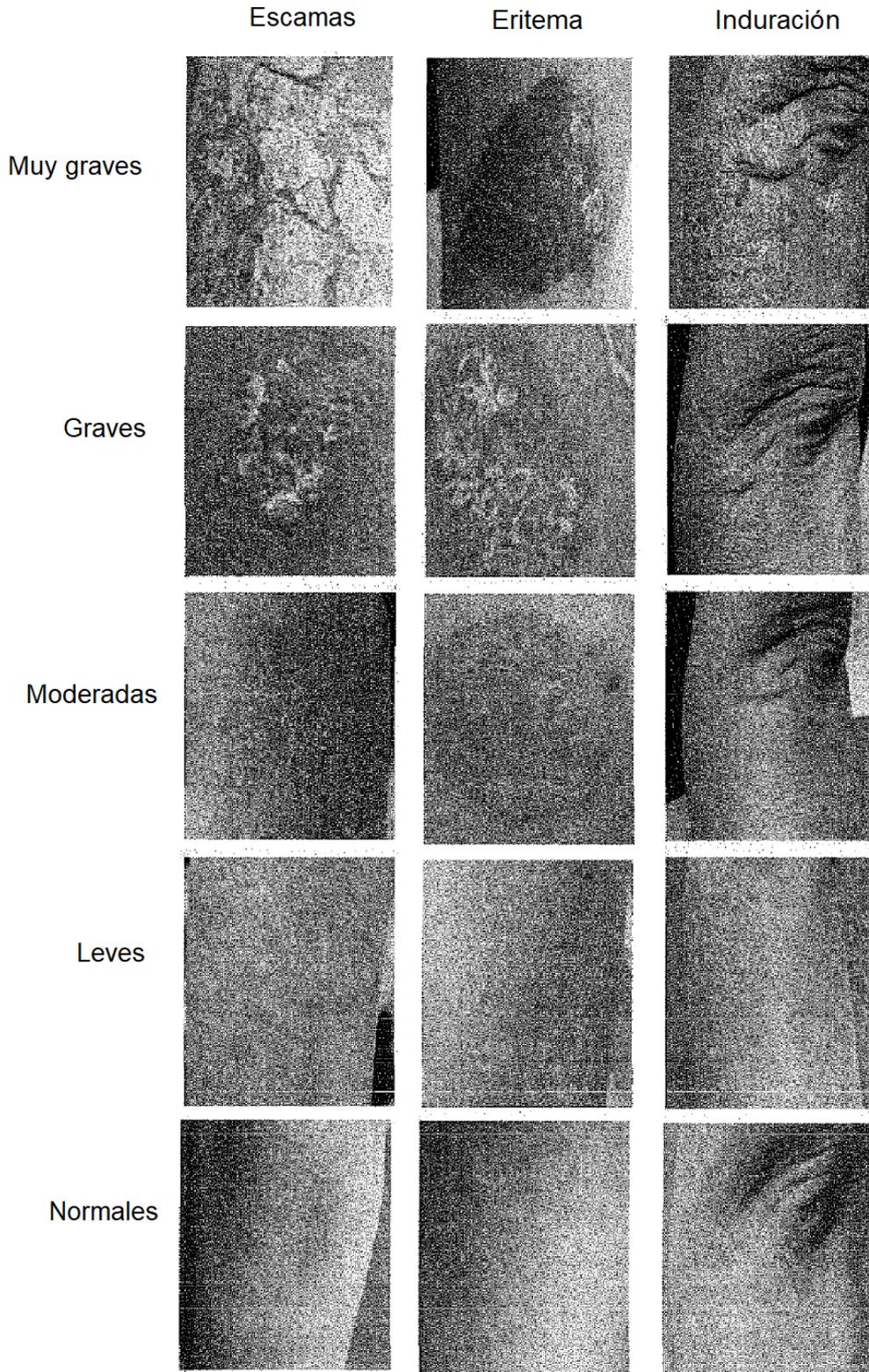


FIG. 2

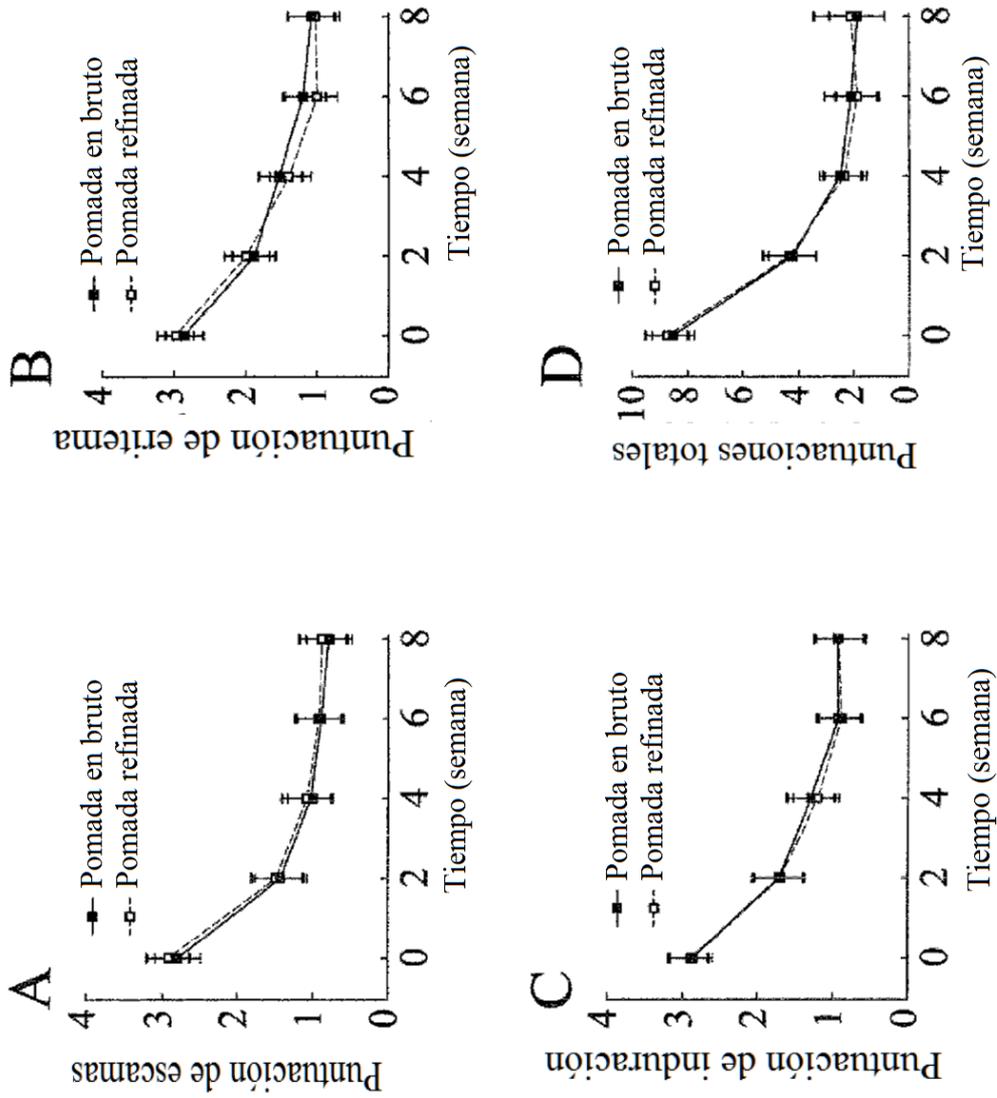


FIG. 3

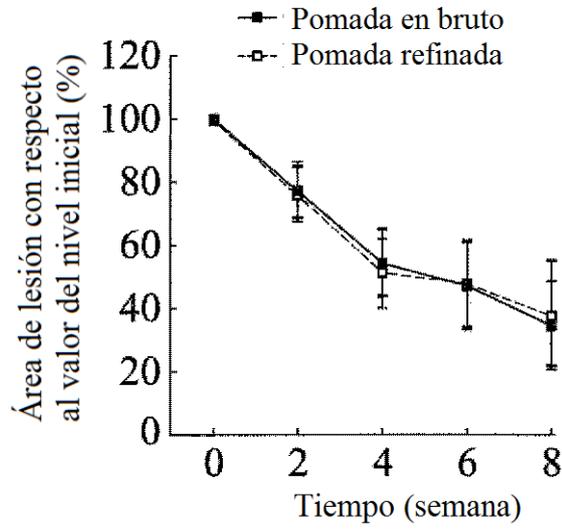


FIG. 4

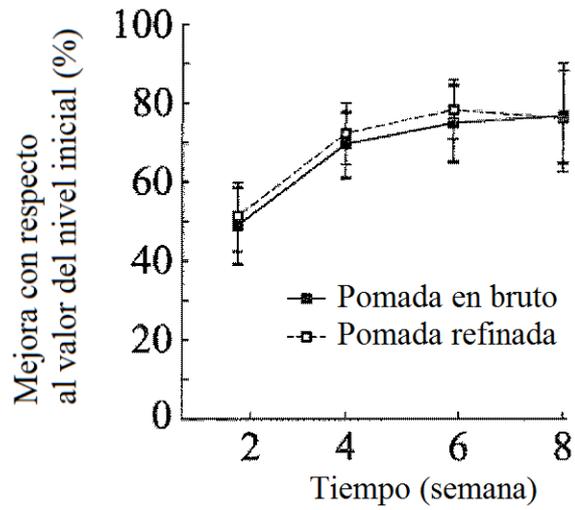


FIG. 5