

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 359**

51 Int. Cl.:

A61K 36/19 (2006.01)

A61K 36/315 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2016 PCT/EP2016/057761**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16162484**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2016 E 16717299 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 3209313**

54 Título: **Un extracto de Indigo naturalis y un procedimiento para preparar el mismo**

30 Prioridad:

09.04.2015 EP 15163060

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

16.04.2019

73 Titular/es:

**GALDERMA SA (100.0%)
Zugerstrasse 8
6330 Cham, CH**

72 Inventor/es:

**CARDINAUD, ISABELLE;
CHANTALAT, LAURENT;
ANDRES, PHILIPPE;
LIN, YIN-KU;
PIERSON, JEAN-THOMAS;
BILY, ANTOINE y
LE BRONEC, LOÏC**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 709 359 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

Un extracto de *Indigo naturalis* y un procedimiento para preparar el mismo

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un extracto de una o más materias primas botánicas, tales como *Indigo naturalis* y su extracto. La presente invención también se refiere a una composición que comprende el extracto, así como el uso de la composición en aplicaciones médicas o cosméticas

Antecedentes

- 10 Los tratamientos convencionales para la soriasis se diseñan generalmente conforme a la edad, género, ocupación y capacidad cognitiva de un paciente, los tipos y distribución de lesiones, la(s) respuesta(s) del paciente a método(s) terapéutico(s) previo(s), y otras anamnesis del paciente. Los métodos terapéuticos principales para la soriasis incluyen un tratamiento tópico, tratamiento sistémico, inyección de compuestos biológicos y fototerapia. Las composiciones para el tratamiento tópico incluyen, por ejemplo, corticoesteroides, antralina (disponible como Margiton®), alquitrán de hulla (disponible como Polytar®), calcitriol (disponible como Silkis®), tazaroteno (disponible como Tazorac®), ácido salicílico, y estas composiciones son adecuadas para tratar a los pacientes de soriasis con síntomas leves. Las preparaciones por vía oral de, por ejemplo, metotrexato (MTX), ciclosporina, y retinoides se usan comúnmente para terapia sistémica, y son adecuados para tratar pacientes de soriasis con síntomas de medios a graves. Los compuestos biológicos incluyen alefacept (disponible como Amevive®), efalizumab (disponible como Raptiva®), etanercept (disponible como Enbrel®) y adalimumab (disponible como Humira®), y son adecuados para inyectar a los pacientes de soriasis con síntomas de medios a graves. La fototerapia, por ejemplo, la fototerapia con ultravioleta B (UVB), la fotoquimioterapia tal como psolareno más ultravioleta A (PUVA), es adecuada para tratar pacientes de soriasis con síntomas graves.

Sin embargo, son deseables métodos terapéuticos adicionales.

Compendio

La materia objeto de la presente invención es como se define en las reivindicaciones 1-13.

- 25 El *Indigo naturalis*, por ejemplo, Qingdai, es un polvo de color azul oscuro preparado a partir de hojas de plantas que llevan índigo o de plantas que producen índigo. Dichas plantas se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en *Indigofera tinctoria* L., *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek (sin. *Strobilanthes cusia* (Nees), *Persicaria tinctoria* (Aiton) Spach. (sin. *Polygonum tinctorum* Aiton, *P. tinctorium* Lour.) e *Isatis tinctoria* L. (sin. *Isatis indigotica* Fort.).

- 30 Uno de los inconvenientes que se encuentran con el uso de *Indigo naturalis* o Qingdai es el color oscuro que produce sobre la piel, y deja manchas en la ropa. Qingdai es el nombre corriente para *Indigo naturalis*. Se extrae a partir de plantas que llevan índigo o plantas que producen índigo con una disolución acuosa de NaOH o KOH, y corresponde a una mezcla de aproximadamente 5-15% de compuestos orgánicos que incluyen alcaloides, entre los que están presentes el índigo y la indirubina, y 85-95% de compuestos inorgánicos, tales como carbonato cálcico e hidróxido cálcico.

- 35 Otro inconveniente puede ser que tradicionalmente, solamente el índigo y la indirubina están controlados en el producto *Indigo naturalis*.

- 40 De este modo, permanece una necesidad no satisfecha de desarrollar un extracto a partir de *Indigo naturalis* o a partir de plantas que llevan índigo o de plantas que producen índigo en un fármaco comercializable, para obtener un extracto menos coloreado que el *Indigo naturalis*, y para caracterizar y controlar la mayor parte de los componentes de tal extracto. Más específicamente, sería ventajoso proporcionar un extracto menos coloreado manteniendo o aumentando su eficacia para el tratamiento o mitigación de enfermedades o trastornos de la piel, tales como la soriasis.

La presente invención resuelve este problema proporcionando un extracto refinado fácil de manejar que retiene los componentes activos de *Indigo naturalis* o Qingdai, para asegurar una eficacia y seguridad clínicas.

- 45 La presente invención, en parte, se ocupa de un procedimiento para obtener un extracto a partir de *Indigo naturalis*, por ejemplo a partir de Qingdai, que a su vez contiene, por ejemplo, indirubina e índigo para tratamiento o mitigación de enfermedades o trastornos de la piel, tales como la soriasis.

En la presente memoria se describe un procedimiento para preparar un extracto a partir de una o más materias primas botánicas, tales como *Indigo naturalis*. El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- 50 a) una etapa de extracción: extracción de *Indigo naturalis* con un primer disolvente polar o moderadamente polar, para obtener una mezcla de extracción;
- b) una etapa de filtración: filtración de la mezcla de extracción para obtener unas aguas de filtrado;
- c) una etapa de concentración: concentración del filtrado para obtener un extracto en bruto;

- d) una etapa de lavado: lavado del extracto en bruto con un disolvente apolar, y opcionalmente un segundo disolvente polar, para obtener una mezcla de lavado, y
- e) una etapa de filtración: filtrado de la mezcla de lavado para obtener un extracto refinado opcionalmente después de una etapa de secado, por ejemplo, conforme a un método convencional de secado.

5 El procedimiento conforme a la invención permite obtener un extracto refinado; tal extracto refinado es como se define más adelante. En la siguiente descripción, la expresión "materia prima botánica" hace referencia a *Indigo naturalis* (por ejemplo, el Qingdai disponible comercialmente).

10 En algunas realizaciones de la descripción, el disolvente usado en la etapa de extracción a) puede incluir dimetilformamida (DMF), acetato de etilo, etanol (que incluye etanol acuoso tal como, por ejemplo, etanol al 85%), dimetilsulfóxido (DMSO), diclorometano (DCM), tetrahidrofurano (THF), dimetilacetamida (DMA), acetona, 2-butanona, acetonitrilo, acetato de isopropilo, 2-metil-tetrahidrofurano (MeTHF), metil *terc*-butil éter, agua, metanol, cloroformo, terpeno (limoneno, p-cimeno, etc.), o una de sus combinaciones. Preferiblemente, el disolvente puede ser acetato de etilo, MeTHF, etanol o etanol acuoso.

15 Además, la etapa de extracción a) puede llevarse a cabo con una relación entre la materia prima botánica y el disolvente (es decir, los gramos del material que ha de extraerse frente a los ml de disolvente) en un intervalo de 1:5 a 1:150 (g/ml), por ejemplo, en un intervalo de 1:5 a 1:100, por ejemplo, 1:6, 1:15, 1:20, 1:30, 1:50, 1:100.

20 En una realización particular, el disolvente usado en la etapa de extracción a) es un disolvente orgánico. Más preferiblemente, el disolvente se selecciona del grupo que consiste en dimetilformamida, acetato de etilo, etanol, dimetilsulfóxido, diclorometano, tetrahidrofurano, dimetilacetamida, acetona, 2-butanona, acetonitrilo, acetato de isopropilo, 2-metil-tetrahidrofurano, metil *terc*-butil éter, metanol, cloroformo, terpeno y una de sus combinaciones.

En algunas realizaciones, la etapa de extracción a) puede repetirse hasta que haya menos de 0,10% de contenido de indirubina (% p/p) en la materia prima botánica restante filtrada en la etapa de filtración b), determinado mediante el método de HPLC descrito en el ejemplo 8A.

25 En algunas otras realizaciones, la etapa de extracción a) se lleva a cabo mediante calentamiento, por ejemplo hasta reflujo.

La etapa de extracción a) se sigue por una etapa de filtración b), y luego una etapa de concentración c) para concentrar las aguas de filtrado, para proporcionar un extracto en bruto. La etapa de filtración b) puede llevarse a cabo en caliente.

En algunas realizaciones, la etapa de lavado d) puede repetirse hasta que la cantidad de indirubina (% p/p) en el extracto refinado es al menos 55% (p/p), determinado mediante el método de HPLC descrito en el ejemplo 8A.

30 En algunas realizaciones, el disolvente usado en la etapa de lavado d) se selecciona del grupo que comprende agua, un alcano con de 5 a 8 átomos de carbono, un alcohol con de 2 a 6 átomos de carbono y una de sus combinaciones. Por ejemplo, el disolvente incluye hexano, heptano, etanol, agua o una de sus combinaciones. Por ejemplo, en la etapa de lavado d), se usan hexano o heptano, y etanol acuoso, en secuencia o simultáneamente en el caso de que se usen dos o más disolventes.

35 Conforme a la invención, el disolvente apolar usado en la etapa d) es hexano.

Conforme a otra realización específica de la descripción, la etapa d) se lleva a cabo con un disolvente apolar y un segundo disolvente polar. Conforme a la invención, el segundo disolvente polar es etanol. Más preferiblemente, el disolvente apolar usado en la etapa d) es hexano, y el segundo disolvente polar es etanol.

40 En algunas otras realizaciones, un extracto en bruto obtenido de la etapa de concentración c) se somete al siguiente procedimiento durante al menos un ciclo, hasta obtener un extracto refinado: el extracto en bruto se lava con un disolvente (etapa d)), y se filtra (etapa e)), para proporcionar un extracto refinado, seguido opcionalmente de una etapa de secado. Conforme a una realización específica, la etapa de lavado d) y la etapa de filtración e) se llevan a cabo mediante un solo ciclo, para obtener el extracto refinado. Cuando se aplica más de un ciclo, se puede usar el mismo o diferentes disolventes para lavado. Además, el extracto en bruto puede lavarse con un disolvente a reflujo, la mezcla se puede enfriar a temperatura ambiente, y luego se filtra para proporcionar un extracto refinado, seguido opcionalmente de una etapa de secado.

45 En una realización preferida, se llevan a cabo dos ciclos. Particularmente, el extracto en bruto obtenido mediante la etapa de concentración c) se lava en un disolvente apolar, preferiblemente hexano (etapa d), y se filtra (etapa e), seguido opcionalmente de una etapa de secado. El extracto de hexano se lava luego con un disolvente polar orgánico, preferiblemente etanol (etapa d), y luego se filtra (etapa e) para obtener un extracto refinado, seguido opcionalmente de una etapa de secado.

Opcionalmente, se lleva a cabo una etapa de micronización después de la etapa e), proporcionando por lo tanto un extracto refinado con un tamaño de partículas entre 25 y 35 μm , preferiblemente de aproximadamente 30 μm .

En otra realización preferida, cuando el extracto refinado se microniza en la última etapa, 99% de las partículas obtenidas es inferior o igual a 30 μm .

En otro aspecto, la presente invención proporciona un extracto refinado a partir de *Indigo naturalis*.

5 La presente invención proporciona también un extracto refinado que contiene indirubina como componente en una cantidad de al menos 55% (p/p) del extracto refinado. En algunas realizaciones, la indirubina está presente en una cantidad de al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80% o 85% (p/p) del extracto refinado. Por ejemplo, la indirubina puede estar en una cantidad de 55-90% (p/p) del extracto refinado, por ejemplo, 55-60%, 55-65%, 55-70%, 55-75%, 55-80%, 55-85%, 55-90%, 60-65%, 60-70%, 60-75%, 60-80%, 60-85%, 60-90%, 65-70%, 65-75%, 65-80%, 65-85%, 65-90%, 70-75%, 70-80%, 70-85%, 70-90%, 75-80%, 75-85%, 75-90%, 80-85%, 80-90%, o 85-90% (p/p) del extracto refinado.

10 Preferiblemente, la presente invención proporciona un extracto refinado que contiene indirubina como componente en una cantidad de al menos 65% (p/p) del extracto refinado.

Preferiblemente, la indirubina está en una cantidad de 65-90% (p/p) del extracto refinado.

15 En algunas realizaciones, el extracto refinado contiene índigo como componente. El índigo puede estar en una unidad de 0-15% (p/p) del extracto refinado, por ejemplo, 0,1-15%, 0,5-15%, 1-15%, 2-15%, o 3-15% (p/p) del extracto refinado.

En algunas otras realizaciones, el extracto refinado contiene además triptantrina como componente. La triptantrina puede estar en una cantidad de 0,01-5% o preferiblemente 0,1-5% (p/p) del extracto refinado, por ejemplo, 0,01-1%, 0,05-1%, 0,1-1%, 0,1-5%, 0,5-1%, o 0,5-5% (p/p) del extracto refinado.

20 En algunas realizaciones más, el extracto refinado contiene además qingdainona como componente. La qingdainona puede estar en una cantidad de 0,1-5% (p/p) del extracto refinado, por ejemplo, 0,1-1%, 0,1-5%, 0,5-1%, o 0,5-5% (p/p) del extracto refinado.

25 En algunas otras realizaciones más, en el extracto refinado, que comprende dos o más de los descritos anteriormente, representa al menos 60% (p/p) del extracto refinado, por ejemplo, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% (p/p), y preferiblemente al menos 90% (p/p). Los componentes caracterizados, que comprenden dos o más de los descritos anteriormente, están en una cantidad de 60-99% (p/p) del extracto refinado, por ejemplo, 60-95%, 65-95%, 70-95%, 80-95%, 85-95%, 90-95%, 60-99%, 65-99%, 70-99%, 80-99%, 85-99% o 90-99% (p/p), y preferiblemente en una cantidad de 90-99% (p/p).

30 En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un extracto refinado como se ha descrito anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición está en la forma para una administración tópica u oral.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición cosmética que comprende un extracto refinado como se ha descrito anteriormente, y un vehículo cosméticamente aceptable. La composición está en una forma para administración tópica.

35 En aún otro aspecto, la presente descripción proporciona un uso del extracto refinado en la preparación de una composición farmacéutica o cosmética para inhibir la proliferación o diferenciación de queratinocitos, inhibir la infiltración de las células mononucleares en la dermis y epidermis, inhibir la alteración vascular que da como resultado vasos sanguíneos hiperplásicos, o inhibir el aumento de moléculas de adhesión sobre células endoteliales. El uso comprende administrar la composición recién descrita a un sujeto (por ejemplo, ser humano) que la necesite.

40 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una composición descrita anteriormente para el tratamiento o mitigación de una enfermedad o trastorno de la piel, seleccionada del grupo que consiste en soriasis, trastornos inflamatorios de la piel, onicomycosis, cáncer de piel, enfermedades inducidas por una queratinización anómala, envejecimiento de la piel, dermatosis pustulosa y linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL).

45 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para inhibir la proliferación o diferenciación de queratinocitos, inhibir la infiltración de las células mononucleares en la dermis y epidermis, inhibir la alteración vascular que da como resultado vasos sanguíneos hiperplásicos, o inhibir el aumento de moléculas de adhesión sobre células endoteliales, que comprende una etapa de poner en contacto el extracto refinado de la presente invención con una célula que lo necesite. Este método puede aplicarse in vitro o in vivo.

50 En aún otro aspecto más, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno de la piel que comprende administrar una cantidad eficaz del extracto refinado conforme a la presente invención a sujetos que lo necesiten. La enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en soriasis, trastornos inflamatorios de la piel, onicomycosis, cáncer de piel, enfermedades inducidas por una queratinización anómala, envejecimiento de la piel, dermatosis pustulosa y CTCL.

En algunas realizaciones, los trastornos inflamatorios de la piel pueden ser dermatitis atópica, eccema o piel sobreinfectada. El envejecimiento de la piel puede ser rejuvenecimiento de la piel, regeneración de tejidos para

cicatrices o envejecimiento de la piel. La queratinización anómala puede ser acné, ictiosis o queratodermia palmoplantar. El cáncer de piel puede ser cáncer de piel precancerosa, por ejemplo, queratosis actínica (AK), enfermedad de Bowen; cáncer de piel, por ejemplo, SCC, BCC, NMSC; melanoma y cáncer de piel inducido por VPH.

Descripción de los dibujos

- 5 Las características y ventajas anteriores y otras de la presente invención serán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos que la acompañan.

Figura 1: cromatogramas de HPLC ilustrativos de índigo (A) e indirubina (B).

Figura 2: cromatogramas de HPLC ilustrativos de triptantrina (A), Qingdai (B) y un extracto refinado del ejemplo 2 (C).

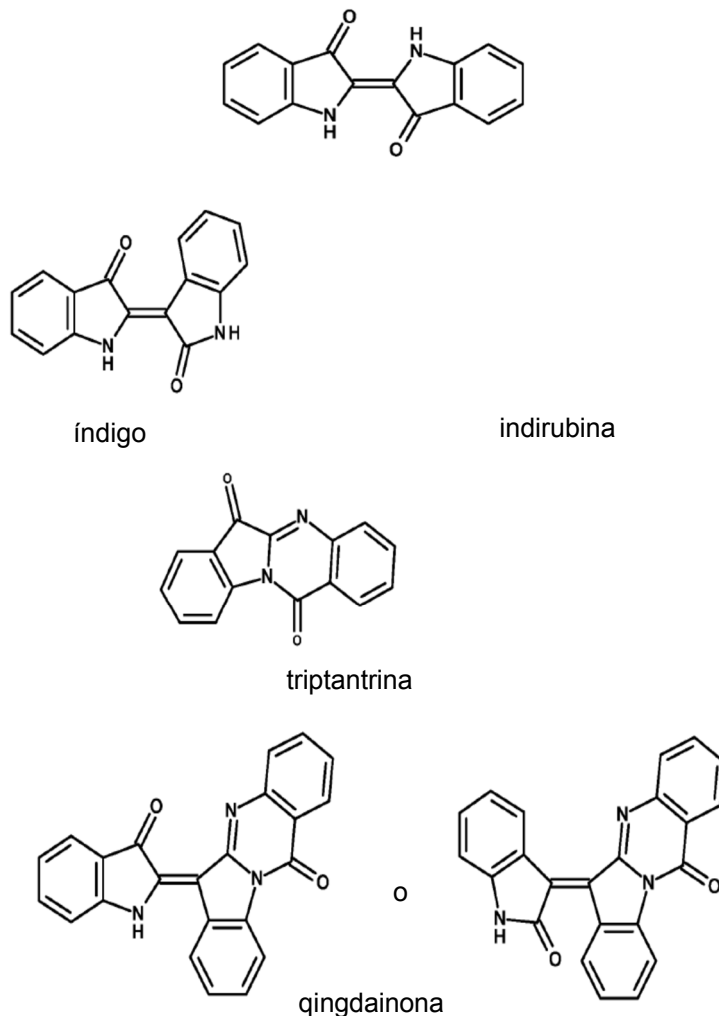
- Figura 3: grupo y dosis para evaluación in vivo de extractos de Qingdai en un modelo de soriasis inducido por IL-22. Se diseñaron cinco estudios y se resumieron en el estudio 1-5, respectivamente. En el estudio 1, se usaron 100 ng y 500 ng de IL-22 en 20 μ l de disolución salina, i.d., para inducción. En el estudio 2-5, se usaron 500 ng de IL-22 en 20 μ l de disolución salina, i.d., para inducción.

- Figura 4: las figuras ilustran las inflamaciones de las orejas después de inyección intradérmica de IL-22. En los estudios, las orejas de los ratones se inyectaron intradérmicamente, y se midió el grosor de las orejas en los días entre inyecciones.

Figura 5: las figuras ilustran los efectos de los extractos de Qingdai en la inflamación de las orejas después de inyección intradérmica de IL-22.

Descripción detallada

- 20 Como se usa en la presente invención, la indirubina, índigo, triptantrina y qingdainona tienen las fórmulas mencionadas en la bibliografía, y más particularmente, las siguientes estructuras.



Un “disolvente polar” hace referencia a un disolvente que tiene una alta constante dieléctrica y un alto momento dipolar; y ejemplos incluyen agua, alcoholes, por ejemplo, alcoholes de 2 a 6 átomos de carbono (tales como etanol), acetonitrilo, dimetilformamida (DMF), y dimetilsulfóxido (DMSO).

5 Un “disolvente moderadamente polar” hace referencia a un disolvente con una constante dieléctrica moderadamente alta; y ejemplos incluyen acetato de etilo, diclorometano (DCM), tetrahidrofurano (THF), dimetilacetamida (DMA), acetona, 2-butanona, acetato de isopropilo, 1,4-dioxano, 2-metiltetrahidrofurano (MeTHF), metil *tert*-butil éter (MTBE).

Un “disolvente apolar” hace referencia a un disolvente con una baja constante dieléctrica; y ejemplos incluyen éter dietílico, éter de petróleo (EP), tolueno y alcanos de 5 a 8 átomos de carbono, por ejemplo, heptano, hexano, pentano o ciclohexano.

10 Una “temperatura ambiente” hace referencia a 18°C-35°C.

La expresión “soriasis” o “enfermedad de soriasis” hace referencia a todos los tipos de soriasis bien conocidos por los expertos en la técnica. Incluye soriasis en placas crónica, soriasis en gotas, soriasis eritrodérmica, soriasis pustulosa, soriasis inversa (también conocida como soriasis flexural), soriasis ungueal, artritis psoriásica.

15 La expresión “extracto refinado” hace referencia a un extracto sólido, semisólido u oleoso, preferiblemente un extracto sólido, que contiene menos de 10% (p/p) de agua y/o disolventes usados en el procedimiento para preparar dicho extracto refinado. Un extracto refinado está caracterizado más preferiblemente mediante un aumento en la cantidad de ingredientes activos, que incluyen alcaloides entre los que están presentes el índigo, indirubina, triptantrina y/o qingdainona, preferiblemente enriquecido en indirubina, comparado con Qingdai o *Indigo naturalis*. Más específicamente, el extracto refinado conforme a la invención comprende al menos 60%, o más preferiblemente más de 70% (p/p) de ingredientes activos, que incluyen índigo, indirubina, triptantrina y/o qingdainona.

20 La expresión “extracto en bruto”, como se usa en la presente invención, hace referencia a un extracto sólido, semisólido u oleoso, preferiblemente un extracto sólido o semisólido, que contiene menos de 15% (p/p) (por ejemplo, 5-15%, 5-10%) de agua y/o disolventes usados en el procedimiento para preparar el extracto refinado. El extracto refinado está menos enriquecido en indirubina que el extracto refinado cuando se compara con Qingdai o *Indigo naturalis*. El extracto en bruto se obtiene mediante la etapa de concentración c) conforme a la invención. La etapa de concentración se lleva a cabo más particularmente enviando las aguas de filtrado a un concentrador (por ejemplo, a presión reducida), para retirar el agua y/o disolventes usados en el procedimiento, y concentrando por lo tanto los ingredientes activos presentes en el extracto, que incluyen índigo, indirubina, triptantrina y/o qingdainona.

25 “Un ciclo”, como se usa en la presente invención, hace referencia a las dos etapas de la etapa de lavado d) y la etapa de filtración e), que se llevan a cabo secuencialmente una vez. “Dos ciclos”, como se usa en la presente invención, hace referencia a las dos etapas de la etapa de lavado d) y etapa de filtración e), que se llevan a cabo secuencialmente dos veces.

30 La expresión “una cantidad eficaz” hace referencia a un nivel de dosis del extracto refinado que proporciona un beneficio terapéutico (por ejemplo, mejora, mitigación o cura de las enfermedades, trastornos o síntomas) a un paciente en promedio.

35 La presente invención proporciona un procedimiento para preparar un extracto refinado a partir de *Indigo naturalis*.

40 El *Indigo naturalis* se obtiene de hojas y tallos, preferiblemente de hojas, de *Indigofera tinctoria* L., *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek (sin. *Strobilanthes cusia* (Nees), *Persicaria tinctoria* (Aiton) Spach. (sin. *Polygonum tinctorium* Aiton, *P. tinctorium* Lour.) e *Isatis tinctoria* L. (sin. *Isatis indigotica* Fort.). Preferably, *Indigo naturalis* se obtiene de hojas y tallos de *Persicaria tinctoria* y/o *Baphicacanthus cusia*.

45 Mientras que *Indigo naturalis* está disponible comercialmente (ejemplos de *Indigo naturalis* disponible comercialmente (planta/proveedor): *Baphicacanthus cusia*/Delong; *Indigofera tinctoria*/KMA exports o Sam Vegetable Colours PVT Ltd; *Isatis tinctoria*/Andrea Primavera o Bleu de Lectoure; *Polygonum tinctorium*/CoeurGarance o EARL 4 saisons), puede producirse a partir de las hojas y tallos de una o más de las plantas anteriores mediante métodos comúnmente conocidos en la técnica. Estos métodos pueden resumirse como sigue: se añaden tallos y hojas recién recolectados de *Persicaria tinctoria* y/o *Baphicacanthus cusia* a una piscina al aire libre, el agua se añade a la piscina para cubrir los tallos/hojas. Después de un empapado durante unos pocos días (26-30°C), los tallos/hojas se habrán descompuesto. Luego, se añade soda con agitación. Cuando el color de la mezcla empapada cambia de verde a violeta oscuro, el precipitado se recoge, se lava (usualmente con agua durante 2-3 veces), y luego se seca para proporcionar polvo de *Indigo naturalis*.

50 Puede prepararse un extracto refinado mediante un procedimiento como se describe en la presente memoria, que comprende las siguientes etapas que consisten en: a) (i) añadir un disolvente de extracción, un disolvente polar o moderadamente polar (tal como un alcohol o acetato de etilo), a un polvo de *Indigo naturalis* para proporcionar una mezcla; (ii) calentar y agitar la mezcla durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 30 min, 1 hora, 2 horas); b) (iii) filtrar la mezcla calentada mientras está caliente para retirar los subproductos insolubles para proporcionar unas aguas de filtrado; c) (iv) concentrar las aguas de filtrado para proporcionar un extracto en bruto; d) (v) añadir un disolvente de

lavado (por ejemplo, agua, o un disolvente apolar, o un disolvente polar o una de sus mezclas) al extracto en bruto para proporcionar una mezcla de lavado; (vi) calentar y agitar la mezcla de lavado durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 30 min, 1 hora, 2 horas); e) (vii) filtrar la mezcla de lavado, por ejemplo, a temperatura ambiente (por ejemplo, 18°C-35°C) para recoger un extracto refinado; (viii) repetir opcionalmente las etapas de (v) a (vii) hasta que la cantidad de indirubina (% p/p) en el residuo (es decir, el extracto) es más de 55% (p/p), preferiblemente más de 65% (p/p), como se determina por el método de HPLC descrito en el ejemplo 8A, (ix) secar opcionalmente el extracto refinado conforme a un método convencional (por ejemplo, secado al aire, liofilización). El disolvente de lavado de las etapas (v) y (viii) puede ser el mismo o diferente.

Conforme a la invención, se prepara un extracto refinado mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- 10 a) extraer *Indigo naturalis* con etanol a reflujo entre 2 y 8 horas,
- b) filtrar la mezcla a una temperatura no inferior a 65°C para obtener unas aguas de filtrado,
- c) concentrar las aguas de filtrado, para obtener un extracto en bruto, dicho extracto en bruto se filtra opcionalmente (con adición de agua) para retirar completamente el disolvente y los últimos componentes aún presentes en el disolvente, y se seca,
- 15 d) (i) lavar el extracto en bruto con hexano a una temperatura no inferior a 50°C entre 15 y 60 min, (ii) filtrar a temperatura ambiente la mezcla obtenida en la etapa d) (i) para obtener un producto, opcionalmente enjuagarla con etanol y agua (iii) lavar el producto obtenido en la etapa d) (ii) con etanol a reflujo, y
- 20 e) filtrar a temperatura ambiente la mezcla de lavado obtenida en la etapa d), y secar el producto resultante a una temperatura inferior a 80°C para obtener un extracto que es opcionalmente micronizado.

En otra realización preferida, cuando el extracto refinado se microniza en la última etapa, el tamaño de partículas es aproximadamente 99% en el intervalo de 25 a 35 µm, preferiblemente de aproximadamente 30 µm.

Como es usada en la presente invención, “aproximadamente” o “alrededor de” se entenderá por una persona de habilidad normal en la técnica, y variará hasta cierto grado en el contexto en el que se use. Si hay usos de la “expresión” que no están claros para la persona de habilidad normal en la técnica dado el contexto en el que se usa, “aproximadamente” o “alrededor de” significarán hasta más o menos 20%, preferiblemente 10% de la expresión en particular.

Los contenidos de ingredientes tales como índigo, indirubina, triptantrina y qingdainona pueden ser cuantificados mediante métodos de HPLC como se describe en el ejemplo 8.

30 El procedimiento recién descrito hace posible obtener un extracto refinado que es fácil de manejar y puede formularse además en composiciones farmacéuticas o cosméticas. Además, el procedimiento proporciona un extracto con una indirubina enriquecida. Al menos 60% (p/p) del componente del extracto refinado obtenido de este modo está caracterizado; preferiblemente al menos 90% (p/p), entre ellos uno o más se seleccionan de la lista que consiste en índigo, indirubina, triptantrina y qingdainona. Aunque el extracto refinado obtenido a partir del procedimiento está en forma sólida, una preparación de una forma líquida para el extracto refinado puede prepararse basada en las necesidades de manejo o formulación, mediante una simple disolución o solubilización del extracto refinado sólido.

En este caso, puede prepararse una forma líquida para el extracto refinado mediante un procedimiento como se describe en la presente memoria, que comprende las etapas siguientes que consisten en: a) (i) añadir un disolvente de extracción, un disolvente polar o moderadamente polar (tal como un alcohol o acetato de etilo), a un polvo de *Indigo naturalis* para proporcionar una mezcla; (ii) calentar y agitar la mezcla durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 30 min, 1 hora, 2 horas); b) (iii) filtrar la mezcla calentada mientras está caliente para retirar los subproductos insolubles para proporcionar unas aguas de filtrado; c) (iv) concentrar las aguas de filtrado para proporcionar un extracto en bruto; d) (v) añadir un disolvente de lavado (por ejemplo, agua, o un disolvente apolar, o un disolvente polar o una de sus mezclas) al extracto en bruto para proporcionar una mezcla de lavado; (vi) calentar y agitar la mezcla de lavado durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 30 min, 1 hora, 2 horas); e) (vii) filtrar la mezcla de lavado, por ejemplo, a temperatura ambiente (por ejemplo, 18°C-35°C) para recoger un extracto refinado; (viii) repetir opcionalmente las etapas de (v) a (vii) hasta que la cantidad de indirubina (% p/p) en el residuo (es decir, el extracto) es más de 55% (p/p), preferiblemente más de 65% (p/p), como se determina por el método de HPLC descrito en el ejemplo 8A, (ix) solubilizar el extracto refinado obtenido de este modo en un disolvente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los disolventes de lavado de las etapas (v) y (viii) pueden ser los mismos o diferentes.

La presente invención proporciona también un extracto obtenible mediante el procedimiento descrito anteriormente a partir de extracto de *Indigo naturalis*, dicho extracto obtenible incluye indirubina como componente en una cantidad de al menos 55% (p/p) del extracto refinado, preferiblemente al menos 65% (p/p). El extracto refinado está en forma sólida y puede prepararse mediante el procedimiento descrito anteriormente o cualquier otro procedimiento adecuado. El extracto refinado puede incluir además índigo, triptantrina y/o qingdainona, que pueden coextraerse junto con la indirubina. En particular, el extracto que contiene múltiples ingredientes puede proporcionar un efecto sinérgico.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el extracto refinado. La composición farmacéutica puede formularse en una forma farmacéutica adecuada para administración tópica u oral,

usando tecnología bien conocida por los expertos en la técnica. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como los empleados ampliamente en la técnica de fabricación de fármacos. Por ejemplo, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir uno o más de los siguientes agentes: disolventes, emulsionantes, agentes de suspensión, de descomposición, agentes aglutinantes, excipientes, agentes estabilizantes, agentes quelantes, diluyentes, agentes gelificantes, conservantes, lubricantes, agentes de retardo de la absorción, liposomas, y similares. Preferiblemente, los disolventes se seleccionan del grupo que consiste en agua, glicerol, etanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, vaselina, un aceite vegetal y cualquier mezcla de estos disolventes. Preferiblemente, la composición farmacéutica se formula en una formulación tópica que puede aplicarse directamente en la piel, por ejemplo, una piel con soriasis. La formulación tópica adecuada para la composición farmacéutica puede ser una emulsión, un gel, una pomada, una crema, un parche, un linimento, un aerosol, un pulverizador, una loción, un suero, una pasta, una espuma, o unas gotas. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica se formula en una preparación externa mezclando el extracto refinado conforme a la presente invención con una base tal como las bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica.

En algunas realizaciones, la dosificación y la frecuencia de administración de la composición de la composición farmacéutica conforme a la presente invención puede variar dependiendo de los siguientes factores: la gravedad de la enfermedad que ha de tratarse, la vía de administración, y el peso, edad, estado físico y respuesta del sujeto que ha de tratarse. En más realizaciones o realizaciones adicionales, la cantidad del extracto refinado está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal/día, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 500, 300 o 100 mg/kg de peso corporal/día.

La presente invención proporciona también una composición cosmética que comprende el extracto refinado. La composición cosmética puede estar presente en una forma adaptada para una aplicación tópica que comprende un vehículo o medio cosmética o dermatológicamente aceptable. "Cosmética o dermatológicamente aceptable" quiere decir medios que son adecuados para un uso en el que se ponen en contacto con la piel o apéndices de piel humana sin plantear un riesgo de toxicidad, intolerancia, inestabilidad, reacción alérgica, etc. En la composición cosmética, el extracto refinado puede solubilizarse previamente en uno o más disolventes cosmética o dermatológicamente aceptables, tales como agua, glicerol, etanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, vaselina, un aceite vegetal o cualquier mezcla de estos disolventes.

El extracto refinado y las composiciones anteriores pueden usarse en el tratamiento o mitigación de una enfermedad o trastorno. Por tratamiento se quiere decir al menos una mitigación de los síntomas asociados con el proceso patológico que aflige al sujeto, en el que la mitigación se usa en un amplio sentido para hacer referencia a al menos una reducción de la magnitud de un parámetro, por ejemplo, síntoma, asociado al proceso patológico que se está tratando, tal como dermatitis, soriasis y similares. Como tal, el tratamiento incluye también situaciones en las que el proceso patológico, o al menos síntomas asociados a él, se inhiben completamente, por ejemplo, se impide que se produzcan, o se detienen, por ejemplo, se terminan, de modo que el huésped no experimenta más el proceso patológico, o al menos los síntomas que caracterizan el proceso patológico. Como tal, el tratamiento incluye tanto la curación como el tratamiento de una enfermedad. Por consiguiente, el extracto y las composiciones anteriores pueden usarse en el tratamiento o mitigación de una enfermedad o trastorno seleccionados del grupo que consiste en soriasis, trastornos inflamatorios de la piel, onicomycosis, cáncer de piel, enfermedades inducidas por queratinización anómala, envejecimiento de la piel y dermatosis pustulosa.

La presente descripción proporciona además un método para inhibir la proliferación o diferenciación de queratinocitos, inhibir la infiltración de las células mononucleares en la dermis y epidermis, inhibir la alteración vascular que da como resultado vasos sanguíneos hiperplásicos, o inhibir el aumento de moléculas de adhesión sobre células endoteliales, que comprende administrar el extracto y composiciones anteriores a un sujeto que lo necesite.

La eficacia del extracto refinado y las composiciones pueden evaluarse mediante modelos *in vitro*, con respecto a sus actividades de inhibir la proliferación o diferenciación, o inflamación. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* pueden llevarse a cabo en la señalización de citocinas, rutas que implican STAT-3/STAT-1, MAPK, NFkB.

La eficacia del extracto refinado y las composiciones pueden evaluarse más mediante modelos *in vivo* con respecto a sus actividades de tratar enfermedades o trastornos. Por ejemplo, pueden ensayarse ratones modificados genéticamente, que incluyen los modelos transgénicos o con genes inactivados.

Las nuevas características de la aplicación se describen particularmente en las reivindicaciones adjuntas. Un mejor conocimiento de las características y ventajas de la presente solicitud se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada, que describe realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la solicitud.

Aunque se han mostrado y descrito en la presente memoria las realizaciones preferidas de la presente solicitud, tales realizaciones se proporcionan sólo como ejemplo. Debe entenderse que diversas alternativas a las realizaciones de la solicitud descrita en la presente memoria pueden emplearse al poner en práctica la solicitud. Los expertos en la técnica apreciarán que son posibles numerosas variaciones, cambios y sustituciones, sin apartarse de la solicitud. Se desea que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de los aspectos de la solicitud, y que de este modo se cubran los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes.

El porcentaje, en la presente memoria, se expresa mediante peso relativo al peso del extracto o el producto especificado, a menos que se especifique de otra manera.

Se describirán más aspectos y ventajas de la invención en la siguiente sección experimental ilustrativa

Ejemplos

5 1. Preparación de extractos refinados de *Indigo naturalis* y métodos analíticos para análisis

Ejemplo 1: preparación de un extracto refinado de *Indigo naturalis*

Qingdai, como se usa en la siguiente preparación, se obtiene de Delong Pharmaceutical (índigo al 2,62% e indirubina al 0,284% (método de HPLC representado en el ejemplo (8A) y triptantrina al 0,0046% (método de HPLC representado en el ejemplo 8B)).

10 Se suspendieron 500 g de Qingdai en 10 l de acetato de etilo. La mezcla se agitó a reflujo durante dos horas, y luego se filtró a 75°C. Las aguas de filtrado se concentraron a presión reducida, para proporcionar un sólido oscuro. El extracto en bruto se agitó en 250 ml de hexano y se calentó a reflujo durante una hora. Después de enfriar a temperatura ambiente, la suspensión se filtró para proporcionar un residuo oscuro (un extracto en bruto).

15 0,50 g del residuo oscuro se sometieron a reflujo en 25 ml de hexano, otra vez durante una hora, y se enfrió a temperatura ambiente, seguido de filtración, para proporcionar un extracto refinado como un sólido rojo oscuro, 452 mg. HPLC: 62,9% de indirubina, 12,9% de índigo y 0,53% de triptantrina.

Ejemplo 2: preparación de un extracto refinado de *Indigo naturalis*

20 500 g de Qingdai, como se usa en el ejemplo 1, se suspendieron en 10 l de alcohol (etanol). La mezcla se agitó a reflujo durante dos horas, y luego se filtró a 75°C. Las aguas de filtrado se concentraron a presión reducida para proporcionar un sólido oscuro, que se agitó en 260 ml de hexano y se calentó a reflujo durante una hora. Tras enfriar a temperatura ambiente, la suspensión se filtró para proporcionar un residuo oscuro.

0,80 g del residuo oscuro se sometieron a reflujo en 24 ml de alcohol (etanol) durante una hora más, y luego se enfrió a temperatura ambiente, seguido de filtración, para proporcionar un extracto refinado como un sólido rojo oscuro (538 mg). HPLC: 83,6% de indirubina, 6,35% de índigo y 0,75% de triptantrina.

25 Ejemplo 3: preparación de un extracto refinado de *Indigo naturalis*

30 500 g de Qingdai, como se usa en el ejemplo 1, se suspendieron en 10 l de acetato de etilo. La mezcla se agitó a reflujo durante dos horas, y luego se filtró mientras estaba caliente. Las aguas de filtrado se concentraron a presión reducida para proporcionar un sólido oscuro. El extracto en bruto se agitó en 250 ml de hexano y se calentó a reflujo durante una hora. Después de enfriar a temperatura ambiente, la suspensión se filtró para proporcionar un residuo oscuro.

0,75 g del residuo oscuro se sometieron a reflujo en 22,5 ml de etanol durante una hora, y se enfrió a temperatura ambiente, seguido de filtración, para proporcionar un extracto refinado como un sólido rojo oscuro (538 mg). HPLC: 77,9% de indirubina, 15,9% de índigo y 0,56% de triptantrina.

Ejemplo 4: preparación de un extracto refinado de *Indigo naturalis*

35 500 g de Qingdai, como se usa en el ejemplo 1, se suspendieron en 2,1 l de DMF. La mezcla se agitó a 50°C durante 40 min. Tras enfriar a 20°C, la suspensión se filtró. Las aguas de filtrado se concentraron a presión reducida para proporcionar un sólido oscuro, que se agitó en 130 ml de hexano y se calentó a reflujo durante una hora. Tras enfriar a 20°C, la suspensión se filtró para proporcionar un residuo oscuro.

40 1,56 g del residuo oscuro se lavaron con 46,8 ml de etanol, y se calentó a reflujo durante una hora, y luego se enfrió a 20°C, seguido de filtración, para proporcionar un extracto refinado (766 mg). HPLC: 66,3% de indirubina, 9,76% de índigo.

Ejemplo 5: preparación de un extracto refinado de *Indigo naturalis*

45 500 g de Qingdai, como se usa en el ejemplo 1, se suspendieron en 3 l de DMF. La mezcla se agitó a 30°C durante 1 hora, y luego se filtró. Las aguas de filtrado se concentraron a presión reducida para proporcionar un sólido oscuro, que se agitó en 230 ml de hexano y se calentó a reflujo durante una hora. Tras enfriar a 20°C, la suspensión se filtró para proporcionar un residuo oscuro.

1,96 g del residuo oscuro se lavaron con 59 ml de etanol al 85% (etanol acuoso al 85%), y se calentó a reflujo durante una hora, seguido de filtración en caliente, para proporcionar un extracto refinado (1,02 g). HPLC: 69,4% de indirubina, 18,7% de índigo y 0,62% de triptantrina.

50 Ejemplo 6: preparación de un extracto refinado de *Indigo naturalis*

100g de Qingdai se extrajeron con 2 l de etanol al 92% (etanol acuoso al 92%) durante 2 horas en condiciones de reflujo. Tras finalizar, la mezcla se filtró en caliente sobre un filtro AF6 (Büchner), para obtener una disolución rojiazul oscura como aguas de filtrado. Estas aguas de filtrado se redujeron hasta sequedad a vacío, para proporcionar 2,4 g de un residuo seco. Este residuo se lavó con 120 ml de hexano durante 1 h a reflujo. Tras finalizar, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente durante 2 h, y luego se filtró a vacío para proporcionar 312,9 mg de un extracto refinado rojo oscuro.

280 mg de este extracto refinado se lavaron con 15 ml de etanol al 92% (etanol acuoso al 92%) durante 1 h a reflujo. Tras finalizar, la disolución se enfrió a temperatura ambiente, y luego se filtró para proporcionar 159 mg de un extracto refinado de color rojo borgoña oscuro después de secar en estufa (80°C) durante 1 h 30 min. (0,18% g). HPLC: 82,31% de indirubina, 8,99% de índigo y 0,81% de triptantrina.

Ejemplo 7: etapa de micronización

La etapa de micronización de extracto refinado de Indigo naturalis obtenido en los ejemplos anteriores se lleva a cabo con el siguiente equipo:

- micronizador: molino en espiral a chorros Diameter 200
- alimentador: este equipo se usa para la dosificación de polvo para alimentar el micronizador. La dosificación se hace gracias a dos tornillos. Este sistema permite una regularidad del flujo.

La micronización consiste en proyectar granos de polvo con chorros de aire. El contacto de los granos permite su explosión.

Los siguientes parámetros de micronización se registran durante la micronización:

- presión de anillo: 6 bar
- presión del inyector: 3 bar
- flujo de la alimentación de polvo: 25 kg/h

El micronizador permite un cercamiento cilíndrico – agujeros alrededor del cercamiento para la inyección de aire.

El polvo se introduce en el micronizador, los granos se impulsan gracias al chorro de aire. Cuando los granos tienen el tamaño bueno, se concentran en el centro del micronizador y se aspiran. Para evitar cualquier contaminación por partículas extrañas o piezas rotas del micronizador, se lleva a cabo una criba adicional (tamiz: 700 µm).

La etapa se realiza manualmente después de la micronización y antes del envasado.

Se llevó a cabo un análisis granulométrico del producto homogéneo obtenido conforme al método de distribución de tamaño de partículas (PSD) [especificaciones analíticas: D99 ≤ 30 µm].

Ejemplo 8: métodos analíticos para análisis

A – Método de HPLC de fase inversa

Se estableció un nuevo método de HPLC de fase inversa para cuantificar simultáneamente el índigo y la indirubina, basado en la European Pharmacopoeia (Pharmeuropa vol. 20, n1 1, enero 2008, págs. 118-119), Chinese Pharmacopoeia (2010 Edition, pág. 185) y bibliografía (Chen LW, Liao W, Yang M, Jia DY, He P, Chen SM, Fu CM. Determination of indigo and indirubin in Indigo Naturalis by HPLC. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 23(6), 714-715; Liu ZY, Su ZT, Gao YN, Yang M. Simultaneously determination of indigo and indirubin in Indigo Naturalis by HPLC, China Pharmacist 2010, 13(3), 324-326).

El sistema cromatográfico (Agilent 1200 series) consistió en un desgasificador G1322A, una bomba G1211A, un automuestreador G1367B, un horno para columna G1316A y un detector DAD G1315B. Otros aparatos incluían un dispositivo ultrasónico SK7200H (China) y un sistema de purificación de agua Milli-Q (EE.UU.).

Se recogieron seis lotes de Qingdai de tres vendedores en China. Se compró Indigo estándar en Tokyo Chemical Industry Co. (Japan, > 98%). La triptantrina se compró en Accela Co. (China, 97%). La indirubina se sintetizó y recristalizó en Hutchison Medipharma (HMP) (> 99% en HPLC).

Se usaron en los experimentos una membrana orgánica para filtro (0,45 µm, China), dimetilformamida (DMF, calidad analítica), metanol (calidad de HPLC), ácido fórmico (AF, calidad de HPLC), trietilamina (TEA, calidad analítica) y agua ultrapura purificada con un sistema de purificación de agua Milli-Q.

Pretratamiento de disolución de DMF: 500 ml de DMF se borbotearon con N₂ seco durante media hora, luego se añadieron 0,5 ml de TEA y se mezcló para proporcionar una disolución de DMF (que contenía TEA al 0,1%, sin oxígeno). Esta disolución de DMF se usó en la preparación de la muestra.

Se suspendieron 50 mg de Qingdai en 50 ml de disolución de DMF. Después de una extracción con ultrasonidos durante 10 min, la suspensión se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm, para generar la disolución de ensayo de Qingdai.

- 5 Se suspendieron 20 mg de extracto refinado (obtenido del ejemplo 2) en 200 ml de disolución de DMF. Después de una extracción con ultrasonidos, la suspensión se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm, para generar la disolución de ensayo del extracto.

- 10 La separación se llevó a cabo en una columna Waters Symmetry C18 (5 µm, 3,9 x 150 mm). La fase móvil fue de metanol al 65% (que contenía 0,05% de AF). El caudal fue de 1,0 ml/min durante 15 min, y la temperatura de la columna fue 25°C. El volumen de inyección fue de 4 µl. La longitud de onda de detección fue 289 nm, para que el índigo y la indirubina pudieran analizarse simultáneamente. El índigo y la indirubina pudieron analizarse simultáneamente en una inyección. Cromatogramas típicos de HPLC del índigo e indirubina se muestran en la figura 1.

B – Método analítico de HPLC para cuantificar triptantrina:

- 15 Se estableció también un nuevo método analítico de HPLC para cuantificar la triptantrina. Se ajustaría la concentración de la muestra en consecuencia debido a la baja concentración de triptantrina, tanto en Qingdai como en su producto enriquecido, el extracto refinado. Los análisis se llevaron a cabo a 25°C en una columna Waters Symmetry C18 (5 µm, 3,9 x 150 mm). La fase móvil fue de metanol (que contenía 0,05% de AF, eluyente B) y agua (que contenía 0,05% de AF, eluyente A). El perfil de elución con gradiente fue como sigue: 50% de B, isocrático (12 min), de 50% a 100% de B (1 min), 100% de B, isocrático (6 min) y de 100% a 50% de B (1 min). El caudal fue de 1,0 ml/min, y la temperatura de la columna fue 25°C. El volumen de inyección fue de 10 µl. La longitud de onda de detección fue 254 nm.

400 g de Qingdai se suspendieron en 20 ml de disolución de DMF. Después de una extracción ultrasónica durante 20 min, la suspensión se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µl para proporcionar la disolución de ensayo de Qingdai.

- 25 15 mg de extracto refinado (obtenido del ejemplo 2) se suspendieron en 20 ml de una disolución de DMF. Después de una extracción ultrasónica, la suspensión se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µl para proporcionar la disolución de ensayo de extracto refinado.

Cromatogramas típicos de HPLC de triptantrina, Qingdai y un extracto refinado se muestran en la figura 2.

Ejemplo 9: estabilidad a largo plazo de un extracto refinado de *Indigo naturalis*

- 30 Un extracto refinado de *Indigo naturalis* preparado conforme al ejemplo 6, se sometió a condiciones de estabilidad. La caracterización por HPLC del extracto preparado es como sigue: 80,16% de indirubina, 10,95% de índigo y 0,64% de triptantrina.

Las condiciones de conservación usadas durante el estudio de estabilidad son 25°C ± 2°C y 60% de HR ± 5% de HR en una cámara climática (Piardi CC1400).

- 35 Conforme a la GUIDELINE ON QUALITY OF HERBAL MEDICINAL PRODUCTS (CPMP/QWP/2819/00, rev. 01), las características de calidad tienen que cumplir con los límites [límites: contenido de indirubina (% de extracto seco) = 65,0-85,0; contenido de índigo (% de extracto seco) = 5,0-15,0; contenido de triptantrina (% de extracto seco) ≤ 5,0.

Las variaciones en el contenido de los marcadores no tienen que superar ± 10% de los valores de la prueba inicial.

Los resultados se muestran en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1:

	T0		1 mes		3 meses		6 meses	
Marcadores	Contenido (% de extracto seco)	% del valor de la prueba inicial	Contenido (% de extracto seco)	% del valor de la prueba inicial	Contenido (% de extracto seco)	% del valor de la prueba inicial	Contenido (% de extracto seco)	% del valor de la prueba inicial
Triptantrina	0,64	100	0,64	100	0,65	101	0,64	100
Índigo	10,95	100	11,03	101	11,10	101	11,12	102
Indirubina	80,16	100	79,19	99	79,52	99	80,17	100
	Huella de HPLC		Cumple		Cumple		Cumple	

- 40 La huella de HPLC a 1 mes, 2 meses y 3 meses cumple con la huella del cromatograma en el T0. De este modo, las características cualitativas cumplen con los límites. La variación de contenido de índigo, indirubina y triptantrina no excede el intervalo aceptable de ± 10% de los valores de la prueba inicial.

De este modo, un extracto refinado de *Indigo naturalis* preparado conforme a la invención es estable al menos 6 meses a 25°C y 60% de HR.

2. Evaluación *in vitro* de extractos refinados de *Indigo naturalis* en ensayos bioquímicos y celulares

Ejemplo 10: ensayos *in vitro* y resultados

- 5 A. Reactivos generales:
DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Cat. N° D2650
Cinasa de Janus 1 (JAK1), Life technologies™, Cat. N° PV4774
Cinasa de Janus 1 (JAK2), Life technologies™, Cat. N° PV4210
Cinasa de Janus 1 (JAK3), Life technologies™, Cat. N° PV3855
- 10 CDK1, Life technologies™, Cat. N° PV3292
CDK2, Life technologies™, Cat. N° PV3267
CDK5, Life technologies™, Cat. N° PV3000
Kit para ensayo de cinasas Z'-LYTE® - Tyrosine 6 Peptide, Life technologies™, Cat. N° PV4122
Kit para ensayo de cinasas Z'-LYTE® - Ser/Thr 12 Peptide, Life technologies™, Cat. N° PV3673
- 15 Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Life technologies™, Cat. N° C11965
RMPI-1640, Life technologies™, Cat. N° A10491
Suero bovino fetal (FBS), Life technologies™, Cat. N° 10099141
Medio EpiLife®, Life technologies™, Cat. N° M-EPI-500-CA
HKGS, Life technologies™, Cat. N° S-001-5
- 20 IL-2 recombinada humana, Peprotech Inc, Cat. N° 200-02
IL-6 recombinada humana, Peprotech Inc, Cat. N° 200-06
IL-3 recombinada humana, Peprotech Inc, Cat. N° 200-03
GM-CSF recombinada humana, Peprotech Inc, Cat. N° 300-03
IL-22 recombinada humana, Peprotech Inc, Cat. N° 200-22
- 25 TNFα recombinado humano, R&D, Cat. N° 210-TA-010
Lipopolisacárido (LPS), Calbiochem, Cat. N° 437650
Anti-CD3 humano, de calidad funcional purificado (aCD3) (clon: OKT3) eBioscience, Cat. N° 16-0037-85
Anti-CD28 humano, de calidad funcional purificado (aCD28) (clon: CD28.2) eBioscience, Cat. N° 16-02897-85
Anticuerpo fosfo-STAT3 (Y705) (conejo-anti-humano), Cell Signalling Technology, Cat. N° 9145
- 30 Anticuerpo fosfo-STAT5 (Y694) (conejo-anti-humano), Cell Signalling Technology, Cat. N° 9359
Anticuerpo de actina (ratón-anti-humano), Sigma-Aldrich, Cat. No. A1978
IgG Alexa 488 de cabra anti-conejo, Life technologies™, Cat. N° A11034
IROYE 800CW de cabra anti-conejo, Li-COR Bioscience, Cat. N° 926-32211
IROYE 800CW de cabra anti-conejo, Li-COR Bioscience, Cat. N° 926-32210
- 35 Kit ELISA de IFNγ humano, R&D, Cat. N° DY285
Kit ELISA de TNFα humano, R&D, Cat. N° DY210
Kit ELISA de IL-1β humano, R&D, Cat. N° DY201

Kit ELISA de IL-6 humano, R&D, Cat. N° DY206

Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue (MTT), Sigma-Aldrich, Cat. N° M2128

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (ensayo de viabilidad celular luminiscente), Promega, Cat. N° G7572

5 CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (ensayo de integridad de membrana homogéneo), Promega, Cat. N° G7891

Ensayo de luciferasa, Promega, Cat. N° E4550

iBlot® Transfer Stack (pila de transferencia), Regular (nitrocelulosa), Life technologies™, Cat. N° IB3010-01

Ioduro de propidio, Sigma-Aldrich, Cat. N° P4170

Ribonucleasa A, Sigma-Aldrich, Cat. N° R6513

10 Tampón 1X PBS (1 l): NaCl, 8,0 g; KCl, 0,2 g; Na₂HPO₄·12 H₂O, 3,58 g; KH₂PO₄, 0,24 g, disuelto en 1 l de H₂O dd Milli-Q, pH ajustado a 7,4

Tampón de carga 1 x SDS: Tris-HCl/pH 8,8 50 mM, 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,1% de azul de bromofenol, DTT 100 mM.

B. Células y líneas celulares

15 HepG2, una línea celular de carcinoma hepatocelular humano, adquirido en Shanghai Institutes for Biological Sciences (SIBS) (Shanghai, China, Cat. N° TCHu 72), se cultivó en DMEM que contiene FBS al 10%.

TF1, una línea celular de eritroleucemia humana, adquirida en American Tissue Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, Cat. N° CRL-2003™), se cultivaron en RMPI-1640 que contiene FBS al 10% y 2 ng/ml de GM-CSF a 37°C con CO₂ al 5%.

20 PBMC: se recogieron muestras de sangre de humanos de donantes adultos sanos en tubos heparinizados. Cada experimento independiente usó sangre de un único donante sano. Se aislaron las células mononucleares (PBMC) usando el reactivo Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia, Cat. N° 17-1440-02) conforme al protocolo recomendado por el fabricante, y se cultivaron en RMPI-1640 que contenía FBS al 10%, a 37°C con CO₂ al 5%.

25 Linfocitos T primarios: se aislaron células mononucleares (PBMC) usando el reactivo Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia, Cat. N° 17-1440-02) conforme al protocolo recomendado por el fabricante. Luego, las células se activaron usando anti-CD3 (1 µg/ml) y anti-CD28 (5 µg/ml) durante 3 días, y se desarrollaron en RMPI-1640 que contenía FBS al 10% y 10 ng/ml de IL-2 a 37°C con CO₂ al 5% cada 2-3 días, durante 2 semanas, antes de llevar a cabo los experimentos.

30 HaCaT, una línea de queratinocitos epidérmicos humanos de The Second Military Medical University (SMMU), China, se cultivó en DMEM que contenía FBS al 10%.

HEKa, queratinocitos epidérmicos humanos aislados de piel de adulto, adquiridos en Life technologies™ (Carlsbad, CA, EE.UU., Cat. N° C-005-5C) y cultivados en medio EpiLife® que contenía HKGS a 37°C con CO₂ al 5%.

35 La línea celular 293/NfκB-Luc se adquirió en Panomics (Fremont, CA, Cat. N° RC0014). Se obtuvo por cotransfección con pNfκB-Luc y pHyg en células embrionarias de riñón humano 293, seguido de selección con higromicina. Las células se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10% y 100 µg/ml de higromicina B (Life technologies™, Cat. N° 10687-010).

C. Ensayo de cinasa

40 Se llevaron a cabo ensayos de cinasa JAK 1/2/3 *in vitro* usando JAK1/2/3 recombinados humanos y un kit para ensayo de cinasas Z'-LYTE® - Tyrosine 6 Peptide. Se llevaron a cabo ensayos de cinasa CDK 1/2/5 *in vitro* usando CDK 1/2/5 recombinados humanos y un kit para ensayo de cinasas Z'-LYTE® - Ser/Thr 12 Peptide. Todas las reacciones (20 µl) se iniciaron añadiendo 2,5 µl de control positivo (CP-690550 para el ensayo de cinasa JAK y estaurosporina para el ensayo de cinasa CDK) o los artículos de ensayo (es decir, muestras) en una disolución de DMSO al 4%, 5 µl de mezcla de sustrato cinasa/péptido o disolución de phospho-péptido, 2,5 µl de disolución de ATP (100 µM) o 1,33 x

45 tampón de cinasa. La placa de ensayo de 384 pocillos (Corning, Cat. N° 3575) se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron luego 5 µl de la disolución de desarrollo a cada pocillo, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora más. Las reacciones de cinasas se detuvieron luego añadiendo 5 µl de reactivo de detención, seguido del registro de la fluorescencia a 450 nm y 520 nm, usando un lector de placas Perkin-Elmer Victor III (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA).

D. Ensayo Acumen

Para la fosforilación de STAT3 inducida por IL-6, se sembraron HepG2 en placas de 96 pocillos, con $5,4 \times 10^3$ por pocillo en medio DMEM sin suero a 37°C, CO₂ al 5%, durante la noche. Después de incubar con CP-690550 o artículos de ensayo durante 30 minutos, las células se estimularon añadiendo 100 ng/ml de IL-6 recombinada humana (1:10) a cada pocillo durante 15 minutos.

Para la fosforilación de STAT5 inducida por IL-3, se sembraron TF-1 en placas de 96 pocillos, con 1×10^4 células por pocillo a 37°C, CO₂ al 5% durante 3 horas. Después de incubación con CP-690550 o artículos de ensayo durante 30 minutos, las células se estimularon añadiendo 100 ng/ml de IL-3 recombinada humana (1:10) a cada pocillo durante 30 minutos.

Las células HepG2 o TF1 se fijaron luego en paraformaldehído al 2% durante 45 minutos a temperatura ambiente, y se incubaron en metanol enfriado con hielo durante 30 minutos. Después de lavar con PBS, las células se incubaron con anticuerpo anti-phospho-STAT3 (Y705) o anti-phospho-STAT5 (Y694) respectivamente, a 4°C durante la noche. Se añadió anticuerpo secundario IgG Alexa 488 de cabra anti-conejo durante 90 minutos antes de los lavados con PBS. Las células se contaron después de incubación en PBS que contenía yoduro de propidio 7,5 μ M y 100 μ g/ml de ribonucleasa A durante 60 minutos en la oscuridad. Se leyó la placa en un instrumento Acumen X3 (TPP Labtech, Hertfordshire SG8, UK).

E. Inmunotransferencia

Se sembraron HEK293 en placas de 6 pocillos, con 2×10^5 células/pocillo a 37°C, CO₂ al 5%, durante la noche. Después de incubación con el artículo de ensayo durante 30 minutos, las células se estimularon con 100 ng/ml de IL-22 durante 30 minutos.

Después del tratamiento, las muestras se recogieron en tampón de carga 1 x SDS. Las muestras de proteína se hirvieron durante 15 m y se recogieron por centrifugación a 14000 g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se usaron o almacenaron inmediatamente a -80°C. Para el análisis de inmunotransferencia, las muestras se separaron sobre un gel de electroforesis con gradiente de Tris-HCl al 10% (Bio-Rad Laboratories). Los geles se transfirieron sobre un iBlot® Transfer Stack, Regular (nitrocelulosa), que se bloqueó en 5% de leche desnatada seca, y se exploró usando anticuerpo anti-phospho-STAT3 (Y705) o anticuerpo anti-actina a 4°C durante la noche, respectivamente. La membrana se incubó luego con anticuerpo secundario IDyE 800CW apropiado, seguido de detección usando el sistema de imagen infrarroja Odyssey (Li-COR Bioscience, Lincoln, NE, EE.UU.).

F. Ensayos de indicadores

Para ensayos de genes indicadores, se sembraron 293/NFkB-Luc en una placa de 96 pocillos, con 4×10^4 células por pocillo, durante la noche. Después de incubación con Andrographolide (LGT) o artículos de ensayo durante 30 minutos, las células se estimularon añadiendo 100 ng/ml de TNF α (1:10) a cada pocillo durante 6 horas. Se prepararon lisados de células retirando los medios y añadiendo tampón para lisis. Se añadió un volumen de 5 x de reactivo para ensayo de luciferasa a cada pocillo antes de la lectura de la placa. Se registró la luminiscencia usando un lector de placas Perkin-Elmer Victor III (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, EE.UU.).

G. Ensayo ELISA

Se sembraron linfocitos T primarios en placas de 96 pocillos, con 8×10^4 células/pocillo. Se añadieron artículos de ensayo en los cultivos, y se incubaron a 37°C, con CO₂ al 5%. Después de 30 minutos, la suspensión celular de cada pocillo se transfirió a otra placa de 96 pocillos revestida con CD3 (1 μ g/ml) y CD28 (5 μ l/ml), y se incubó a 37°C, con CO₂ al 5%, durante 22 horas. Se retiraron los medios y se almacenó a -80°C hasta el ensayo. Se determinaron las concentraciones de IFN γ usando un kit ELISA comercial (R&D Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se sembraron PBMC en placas de 96 pocillos, con 3×10^4 células/pocillo. Se añadieron luego artículos de ensayo en los cultivos, y se incubaron a 37°C, con CO₂ al 5%. Después de 30 minutos, se añadió 1 μ l/ml de LPS (1:10) al cultivo. Para la cuantificación de los niveles de proteína, las placas se incubaron durante 18 horas. Se retiraron los medios y se almacenó a -80°C hasta el ensayo. Se determinaron las concentraciones de TNF α , IL-1 β y IL-6 usando kits ELISA comerciales (R&D Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante.

H. Ensayo del MTT

Se sembraron HaCaT en placas de 96 pocillos, con 4×10^4 células/pocillo, durante la noche. Se añadieron luego estaurosporina o artículos de ensayo en el cultivo y se incubaron a 37°C, con CO₂ al 5%, durante 72 horas. Después de la retirada de los medios, las células de las placas de 96 pocillos se expusieron a 100 μ l de MTT (0,5 mg/ml) en DMEM que contenía FBS al 10% por pocillo, y se incubaron durante 3 horas a 37°C, CO₂ al 5%. Posteriormente, los sobrenadantes se retiraron, y se añadieron 150 μ l de DMSO a cada pocillo. La placa se incubó en la oscuridad durante 10 minutos, y se registró inmediatamente la absorbancia a 492 nm, usando un lector de microplacas Multiskan MK3 (Thermo Life Sciences, HK, China).

I. Ensayo de viabilidad celular

Se usó el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay para investigar la viabilidad celular. Se sembraron HEKa en una placa de paredes opacas de 96 pocillos, con 1×10^4 células/pocillo, durante la noche. Se añadieron luego ditranol o artículos de ensayo al cultivo, y se incubó a 37°C, con CO₂ al 5%, durante 48 horas. Las células se lisaron con reactivo CellTiter-Glo®, igual al volumen de los medios de cultivo celular presentes en cada pocillo, y los contenidos se mezclaron durante 2 minutos para inducir la lisis celular. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia. La luminiscencia se registró usando un lector de placas Perkin-Elmer Victor III (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, EE.UU.).

J. Ensayo de liberación de LDH

Se usó un kit de ensayo de liberación de lactato-deshidrogenasa (LDH) para investigar la citotoxicidad. Se sembraron HEKa en placas de paredes opacas de 96 pocillos, con 4×10^4 células/pocillo, durante la noche. Se añadieron luego ditranol o artículos de ensayo al cultivo, y se incubó a 37°C, con CO₂ al 5%, durante 24 horas. Se prepararon sobrenadantes y lisados celulares. Se añadió un volumen de 1 x de reactivo CytoTox-ONE™ igual al volumen de sobrenadantes o lisados celulares a cada pocillo, seguido de mezclado durante 30 segundos e incubación a 25°C durante 10 minutos. Se añadió una disolución para detención igual a un volumen de 50% de los sobrenadantes o lisados celulares a cada pocillo para detener la reacción, y se registró la fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm, usando un SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CAL, EE.UU.).

K. Activación de NFκB inducida por TNFα

Las citocinas y quimiocinas proinflamatorias juegan papeles importantes en la patogenia de la soriasis. NFκB es claramente uno de los reguladores más importantes de la expresión de los genes de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Por lo tanto, se investigó la potencia inhibidora de Qingdai y sus extractos refinados sobre la activación de NFκB dependiente de TNFα en HEK 293/NFκB-Luc. Como se muestra en la tabla 1, TNFα estimularon la expresión de luciferasa dependiente de NFκB, y el pretratamiento de células con glucósido de Tripterygium bloqueó la activación de NFκB de un modo dependiente de la concentración. El extracto refinado de *Indigo naturalis* tuvo actividades de microgramos/g sobre la activación de NFκB dependiente de TNFα en las condiciones experimentales (véase la tabla 1).

L. Determinaciones de CI₅₀

Todos los valores de CI₅₀ se determinaron usando un programa informático XLfit™ (versión 2.0) de ID Business Solutions (Guildford, UK). El fondo se definió en cultivos con células tratadas con DMSO solamente, y se restó para los cálculos de CI₅₀.

M. Resultados

Algunos resultados de ensayos *in vitro* de extractos refinados de *Indigo naturalis* se muestran en la tabla 2 siguiente, en la que *Indigo naturalis* A se obtiene de Delong Pharmaceutical: (índigo, 2,62%; indirubina, 0,284%; triptantrina, 0,0046%).

Tabla 2

Muestra	Producción de citocina proinflamatoria	Proliferación de HaCaT	Viabilidad de HEKa
	CI ₅₀ (NFκB) μg/ml	CI ₅₀ μg/ml	CI ₅₀ μg/ml
Estaurosporina		3,18 (nM) ± 2,19	
LGT	0,00045		
<i>Indigo naturalis</i> A**		2,42/2,43	
Ejemplo 4	10,87/63,53/ 10,37/25,75	1,57/<0,82/1,02	
Ejemplo 1	8,47/15,40		2,91 ± 0,49 (n=2)
Ejemplo 3	37,23/>100		1,71 ± 0,54 (n=3)
Ejemplo 2	51,03/41,79		1,75 ± 0,48 (n=4)
Ejemplo 5	24,66/32,97		2,21 ± 0,45 (n=4)

***Indigo naturalis* A: *Indigo naturalis* de Delong Pharmaceutical: índigo, 2,62%; indirubina, 0,284%; triptantrina, 0,0046%

3. Evaluación in vivo de extractos refinados de *Indigo naturalis* en modelos animales

Ejemplo 11: ensayos *in vivo* y resultados

A. Materiales y métodos

Animales

Ratones BABL/c, machos, 19-22 g de peso, adquiridos en Shanghai SLC AnimalCenter.

5 Temperatura ambiente: 24 ± 1 °C

Humedad relativa ambiente: 40-70%

Ciclo de luz: luz fluorescente durante 12 horas de luz (8:00-20:00) y 12 horas de oscuridad

Alojamiento del animal: 4 ratones/jaula

Alimentación: libre acceso al alimento (irradiado, Shanghai SLAC Laboratory Animal Co. Ltd., China)

10 Agua: libre acceso a agua corriente de suministro local (filtrada en primer lugar por una máquina de agua ultrapura Molanimal del suministro de agua municipal)

Instrumentos

Termociclador Peltier MJ Research PTC-200 (Alpha Unit™ Block Assembly para sistemas de PTC DNA Engine™)

Applied Biosystems 7500 realtime PCR System

15 Calibre micrómetro Digimatic: Mitutoyo, Japón, precisión: 0,001 mm

Reactivos

IL-22 recombinado de ratón (rmIL-22), Novoprotein (sinobio), Cat. C047, Lot. 0375351

Kit High capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems, Part nº: 4368813, Lot: 0909069

Thermo Scientific ABsolute SYBR Green Rox Mix, Thermo Scientific, Cat: AB-1163/A, Lot: 0911/16

20 Control positivo

Protopic® (tacrolimus, FK506), pomada al 0,1%, Astellas Toyama Co., Ltd. Toyama Plant, H20100079, Lot: 028680.

Regimen de administración

25 Se administraron por vía tópica diferentes concentraciones de las muestras de ensayo, vehículo, o 0,1% de pomada FK506, al 1%, una hora después de la inducción de modelo, y luego se dieron diariamente desde el día 1 hasta el día 11, dos veces al día. El primer día de administración de un artículo de ensayo se contempló como el día 0.

Vía de administración

Aplicación tópica, b.i.d.

Establecimiento de modelos de ratón de soriasis inducida por IL-22

30 Se administró una inyección intradérmica de 20 µl de PBS, solo o que contenía 100 o 500 ng de IL-22 recombinado de ratón (eBioscience), en las orejas de ratones anestesiados, usando una aguja de 0,30 mm de diámetro (30 G), cada dos días, durante 11 días. Se midieron los grosores de las orejas antes de la inyección el día 0 y a partir de ahí los días sin inyecciones. Las medidas en las orejas se tomaron en el centro de las orejas, usando un calibre micrómetro Digimatic (Mitutoyo).

35 Veinticuatro horas después del último tratamiento con IL-22, los ratones fueron sacrificados, y se recogieron las orejas para un análisis más extenso.

Examen histológico

Se recogieron orejas en la necropsia, se fijaron en formol al 10% tamponado con fosfato, se incluyeron en parafina, se seccionaron, y se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E). Las secciones microscópicas se clasificaron mediante el número y gravedad de las lesiones.

40 Métodos estadísticos

Los resultados de grosores de orejas se expresaron como media $\pm$ S.E.M. El AUC (área bajo la curva) de la hinchazón de las orejas se calculó mediante los datos de grosor de las orejas desde el día 0 hasta el día 11, y se analizaron mediante métodos ANOVA de medidas repetidas con el paquete informático JMP®. Los datos de la proteína citocina y de expresión de genes se evaluaron con un ANOVA de un factor, y seguido de una prueba t de Student para un análisis a posteriori (post-hoc). (El nivel de significación se fijó a $p < 0,05$).

Grupo y dosis

Véase la figura 3.

Resultados

Algunos resultados de los ensayos *in vivo* de algunos extractos refinados de *Indigo naturalis* se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Estudios in vivo	Grupo	Grosor de las orejas en el día 11 (μm)	AUC del grosor de las orejas	Inhibición de AUC del grosor de las orejas (%)
Estudio 1 (cf. Fig. 4)	Control-disolución salina (naïve)	207,8 $\pm$ 1,8, 202,8 $\pm$ 2,2 (d15)	61	
	IL-22, 100 ng	248,3 $\pm$ 1,9, 255,3 $\pm$ 15,1 (d15)	590	
	IL-22, 500 ng	311,3 $\pm$ 18,0, 296,3 $\pm$ 5,0	1055	
Estudio 2	Control naïve	236,7 $\pm$ 2,8	172	
	Control vehículo 1	371,3 $\pm$ 8,7	1281	
	FK506 (0,1%)	256,8 $\pm$ 3,5	403	79,2
	<i>Indigo naturalis</i> B* (10%)	328,8 $\pm$ 16,8	749	48
Estudio 3 (cf. Fig 5 (A))	Control naïve	230,2 $\pm$ 4,4	165	
	Control vehículo	428,3 $\pm$ 6,6	1256	
	FK506 (0,1%)	278,8 $\pm$ 5,0	369	81,3
	<i>Indigo naturalis</i> B* (10%)	349,3 $\pm$ 14,6	703	50,7
	Ejemplo 4 (1%)	289,3 $\pm$ 17,4	876	34,8
	Ejemplo 4 (0,1%)	408,7 $\pm$ 18,0	975	25,7
Estudio 4	Control naïve	233,1 $\pm$ 3,6	238	
	Control vehículo	356,4 $\pm$ 11,8	1301	
	FK506 (0,1%)	260,4 $\pm$ 4,5	446	80,4
	Ejemplo 4 (0,5%)	310,4 $\pm$ 4,4	969	31,3
	Ejemplo 4 (0,1%)	303,8 $\pm$ 4,3	868	40,7
	Ejemplo 4 (0,02%)	302,8 $\pm$ 6,4	922	35,7
Estudio 5 (cf. Fig. 5 (B))	Control naïve	214,5 $\pm$ 1,1	143	
	Control vehículo	334,3 $\pm$ 3,3	1194	
	FK506 (0,1%)	263,4 $\pm$ 6,3	454	70,4
	Ejemplo 3 (0,02%)	289,6 $\pm$ 8,0	751	42,2
	Ejemplo 2 (0,02%)	276,3 $\pm$ 3,2	627	53,9
	Ejemplo 5 (0,02%)	275,5 $\pm$ 5,9	677	49,2

**Indigo naturalis* B: *Indigo naturalis* de Qingfeng Pharmaceutical: índigo, 2,02%; indirubina, 0,216%; triptantrina, 0,0032%

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un extracto refinado a partir de *Indigo naturalis*, que comprende las etapas de:
 - a) extraer *Indigo naturalis* con etanol a reflujo entre 2 y 8 horas,
 - b) filtrar la mezcla a una temperatura no inferior a 65°C para obtener unas aguas de filtrado,
 - c) concentrar las aguas de filtrado, para obtener un extracto en bruto, dicho extracto en bruto se filtra opcionalmente (con adición de agua) para retirar completamente el disolvente y los últimos componentes aún presentes en el disolvente, y se seca,
 - d) (i) lavar el extracto en bruto con hexano a una temperatura no inferior a 50°C entre 15 y 60 min, (ii) filtrar a temperatura ambiente la mezcla obtenida en la etapa d) (i) para obtener un producto, opcionalmente enjuagarla con etanol y agua (iii) lavar el producto obtenido en la etapa d) (ii) con etanol a reflujo, y
 - e) filtrar a temperatura ambiente la mezcla de lavado obtenida en la etapa d), y secar el producto resultante a una temperatura inferior a 80°C para obtener un extracto que es opcionalmente micronizado.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se lleva a cabo una etapa de micronización después de la etapa e), proporcionando por lo tanto un extracto refinado con un tamaño de partículas entre 25 y 35 µm, preferiblemente de alrededor de 30 µm.
3. Un extracto refinado obtenible mediante el procedimiento de la reivindicación 1 o 2.
4. El extracto refinado de la reivindicación 3, que comprende indirubina como componente, y opcionalmente uno o más de índigo, triptantrina y qingdainona.
5. El extracto refinado de la reivindicación 3, que comprende indirubina como componente en una cantidad de al menos 65% (p/p) del extracto refinado, preferiblemente 65-90% (p/p) del extracto refinado.
6. El extracto refinado de las reivindicaciones 4 o 5, que comprende además índigo como componente, preferiblemente en una cantidad de 0,1-15% (p/p) del extracto refinado.
7. El extracto refinado de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende además triptantrina como componente, preferiblemente en una cantidad de 0,1-5% (p/p) del extracto refinado.
8. El extracto refinado de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que comprende además qingdainona como componente, preferiblemente en una cantidad de 0,1-5% (p/p) del extracto refinado.
9. El extracto refinado de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que dos o más de los componentes de indirubina, índigo, triptantrina y qingdainona, están en una cantidad de 90%-99% (p/p) del extracto refinado.
10. Una composición farmacéutica que comprende el extracto refinado de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Un extracto refinado de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno, seleccionada del grupo que consiste en soriasis, trastornos inflamatorios de la piel, onicomycosis, cáncer de piel, enfermedades inducidas por una queratinización anómala, envejecimiento de la piel, dermatosis pustulosa y CTCL.
12. El extracto refinado para uso de la reivindicación 11, en el que el tratamiento de una enfermedad o trastorno es el tratamiento de soriasis.
13. El extracto refinado para uso de la reivindicación 12, en el que la soriasis es soriasis en placas crónica, soriasis en gotas, soriasis eritrodérmica, soriasis pustulosa, soriasis inversa, soriasis ungueal y/o artritis psoriásica.

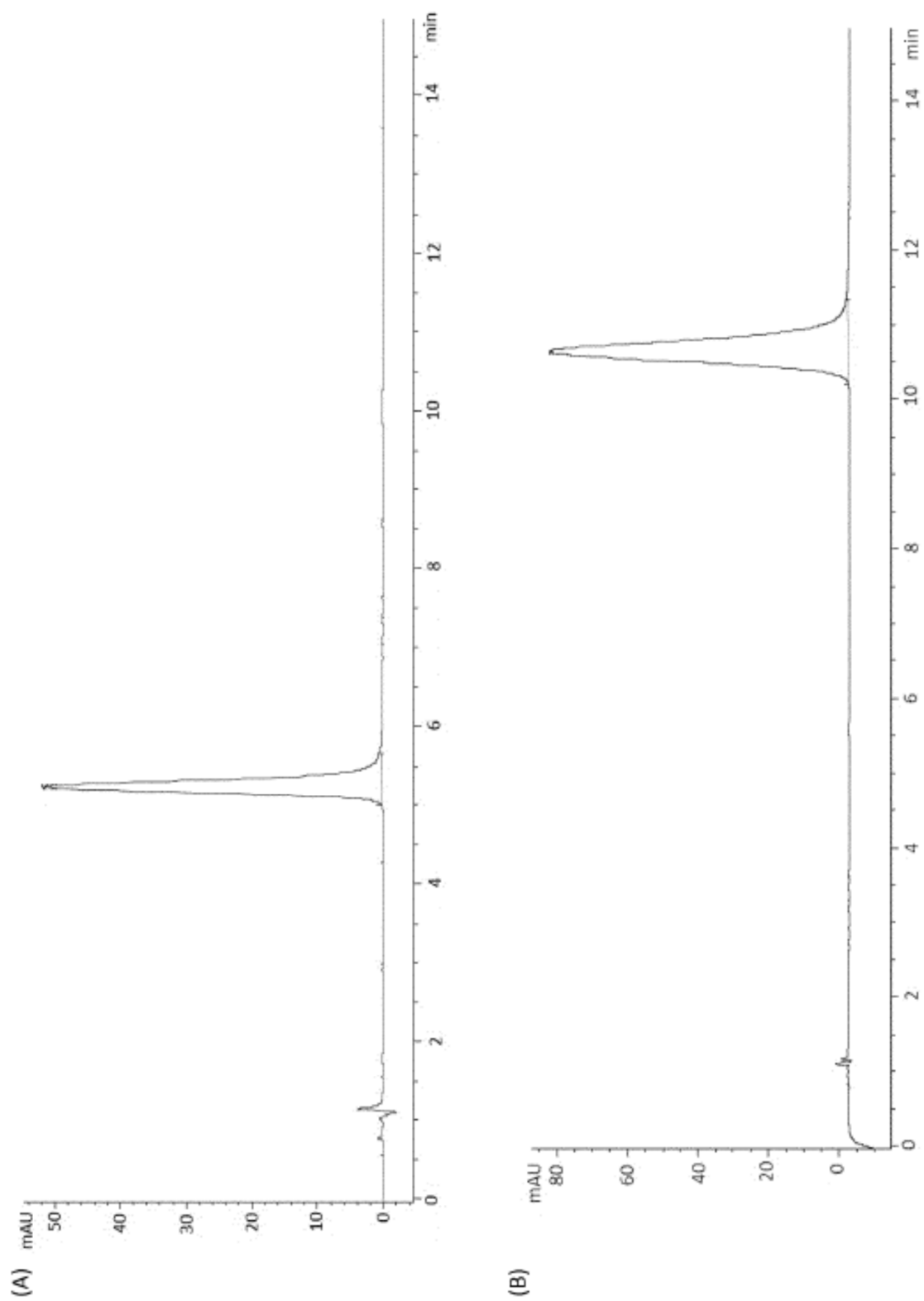


FIGURA 1

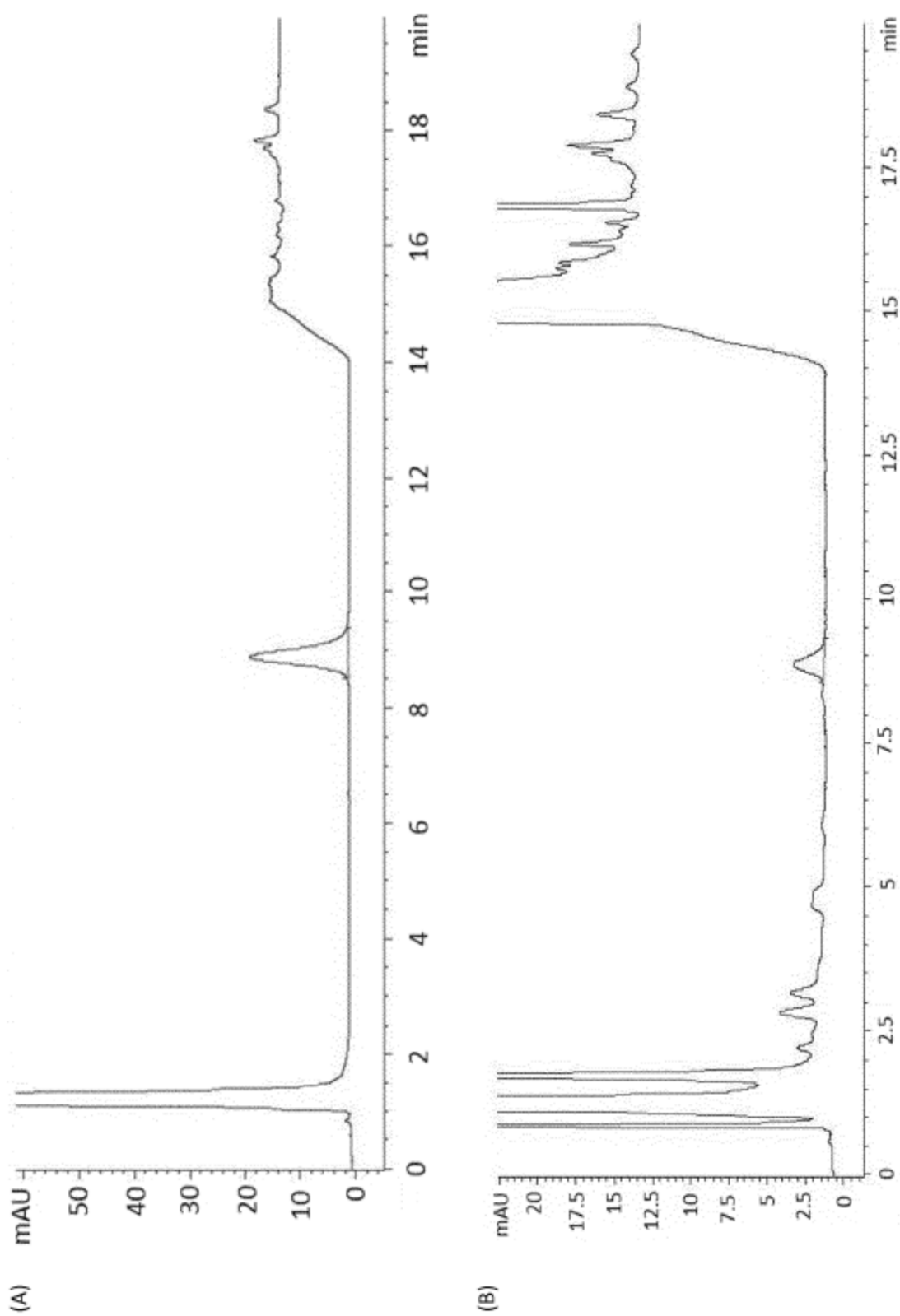


FIGURA 2

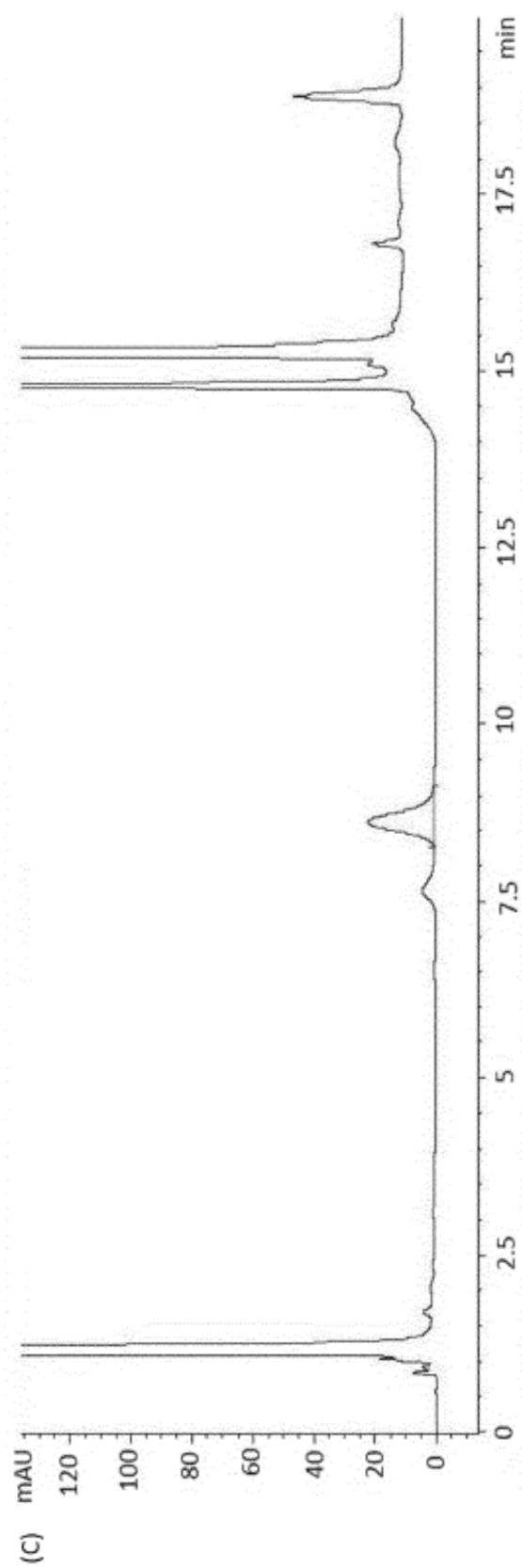
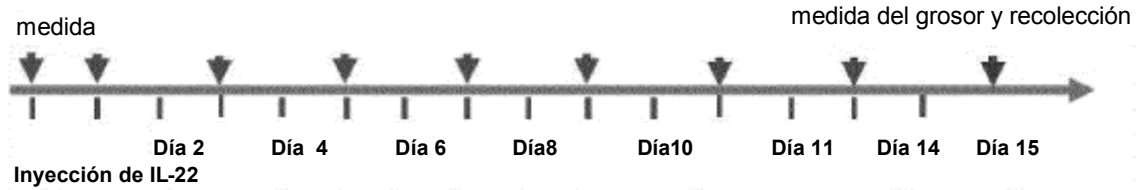


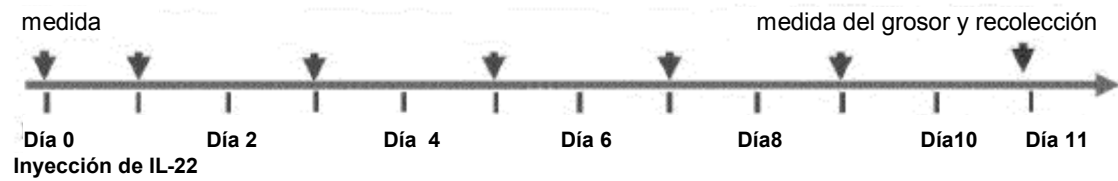
FIGURA 2. CONT.

ESTUDIO 1



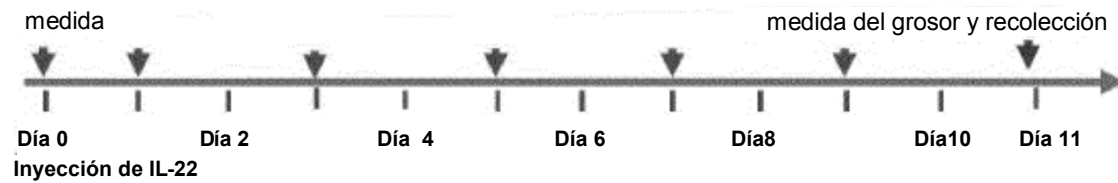
ESTUDIO 2

Vehículo: 15% de vaselina+25% de cera+60% de aceite de oliva



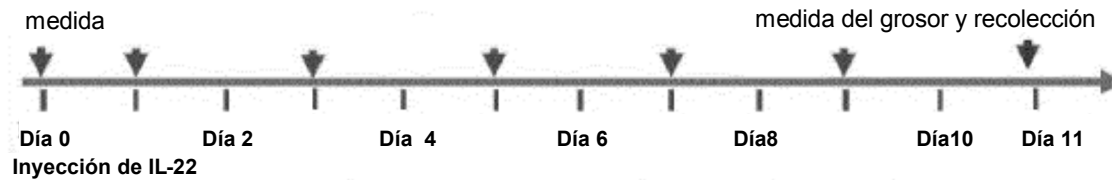
ESTUDIO 3

Vehículo: 15% de vaselina+25% de cera+60% de aceite de oliva



ESTUDIO 4

Vehículo: aceite de oliva



ESTUDIO 5

Vehículo: aceite de oliva

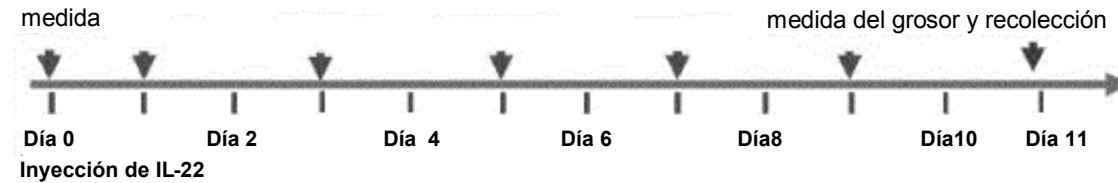
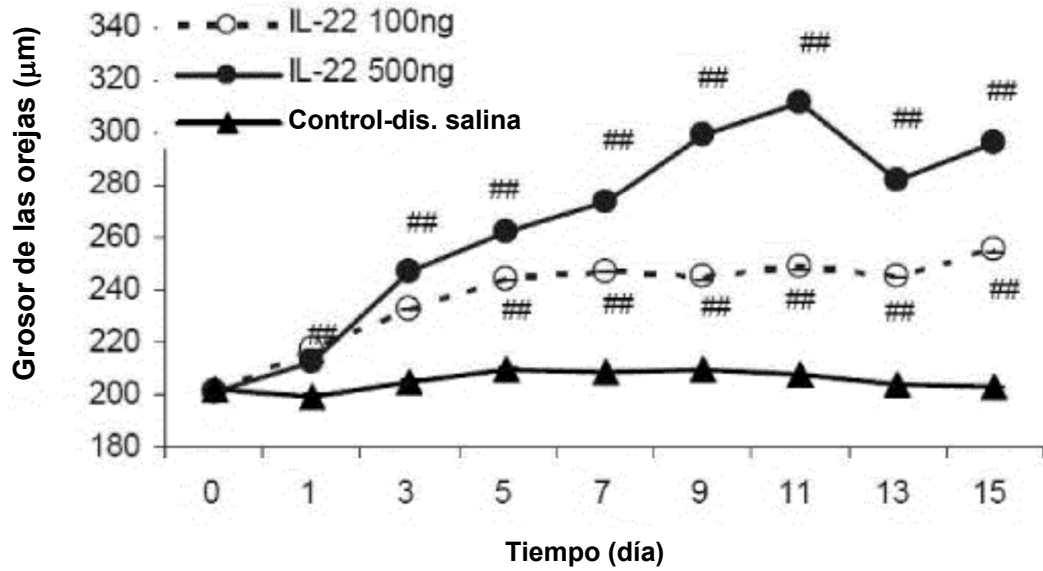
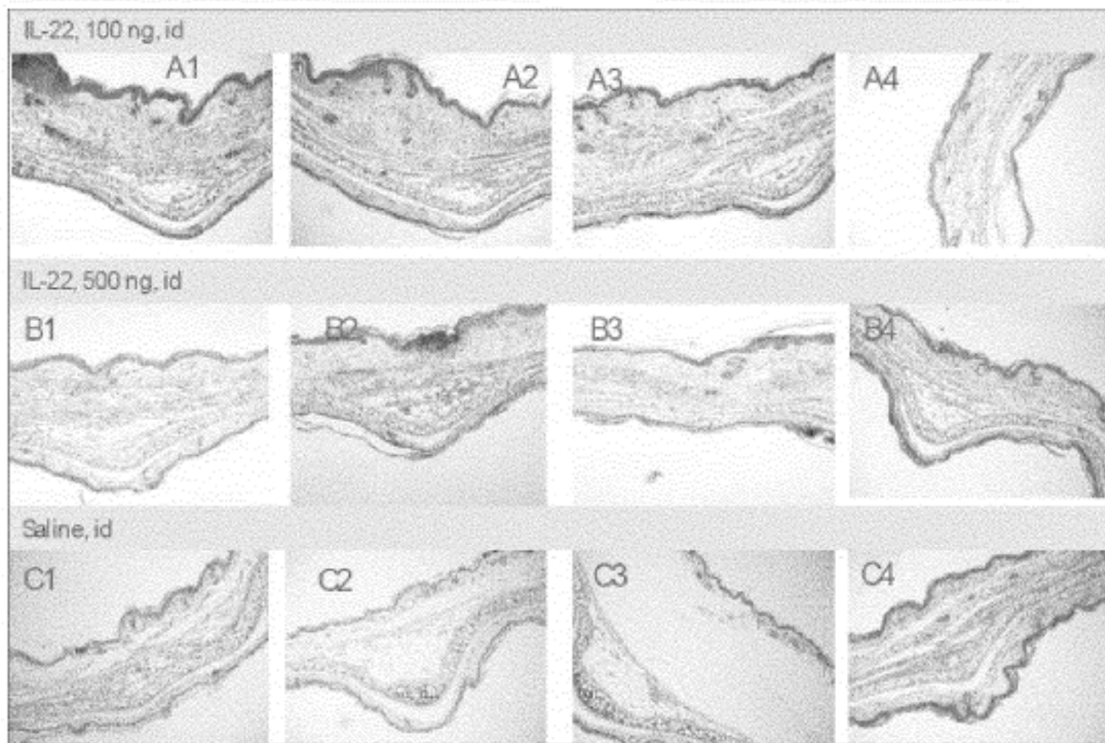


FIGURA 3

Grosor de las orejas después de inyecciones múltiples con IL-22



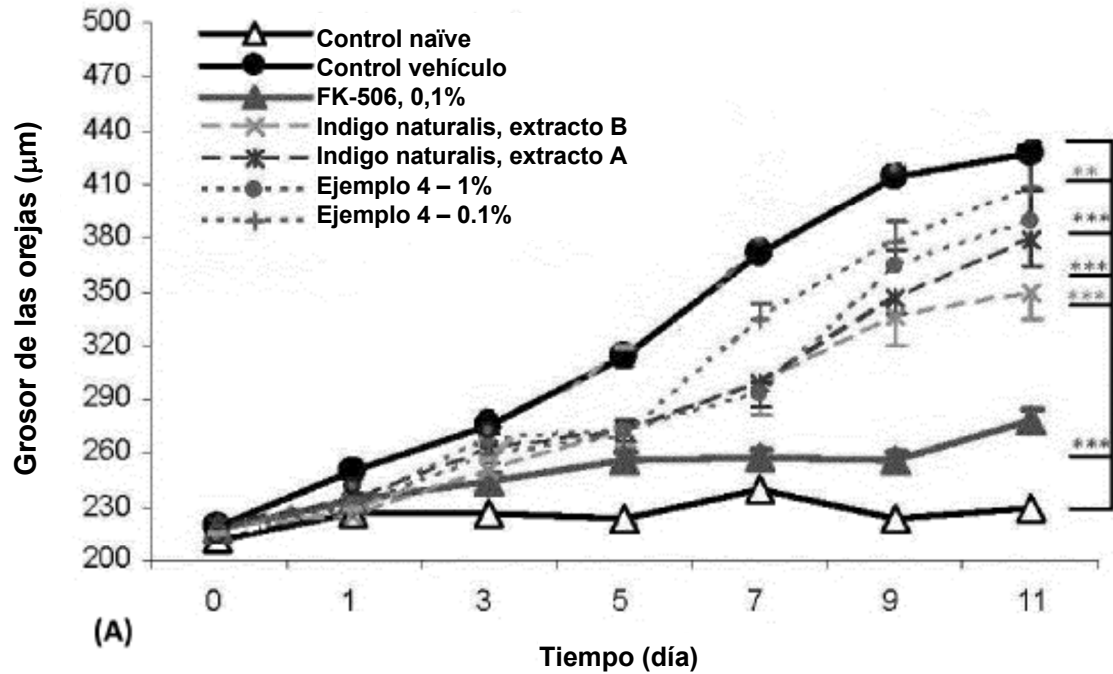
(A)



(B)

FIGURA 4

Grosor de las orejas



Grosor de las orejas

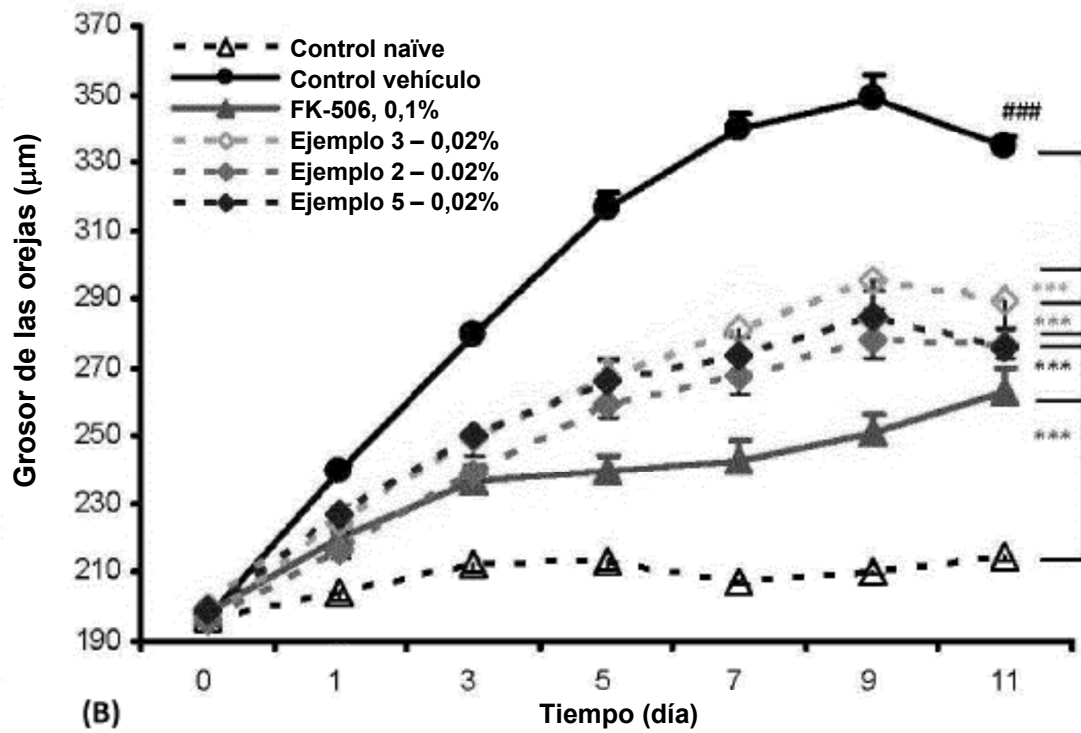


FIGURA 5