

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 056**

51 Int. Cl.:

A61K 31/706 (2006.01)
A61K 36/81 (2006.01)
A61P 17/12 (2006.01)
A61K 8/97 (2007.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2012** **E 12154282 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019** **EP 2522357**

54 Título: **Tratamiento y/o prevención de la inflamación y de las fotolesiones cutáneas y fotoprotección de la piel con un extracto hidrosoluble de una planta del género Solanum**

30 Prioridad:

12.05.2011 TW 100116659

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2019

73 Titular/es:

G & E HERBAL BIOTECHNOLOGY CO., LTD.
(100.0%)
1F., 26, Lane 31, Sec. 1, Huan-Dong Road, Hsin-shi Dist
Tainan City, TW

72 Inventor/es:

KUO, KOU-WHA y
SHEU, HAMM-MING

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 734 056 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

Tratamiento y/o prevención de la inflamación y de las fotolesiones cutáneas y fotoprotección de la piel con un extracto hidrosoluble de una planta del género *Solanum*

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional Taiwanesa N.º 100116659, Presentada el 12 de mayo de 2011.

10 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la inflamación y/o la fotolesión cutánea, que contiene un extracto hidrosoluble de una planta del género *Solanum*. La composición también tiene un efecto fotoprotector y puede usarse como una composición cosmética.

15 En organismos aerobios, el oxígeno se utiliza en la respiración aerobia, produciendo así especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres. La luz ultravioleta (UV), la radiación ionizante y determinadas medicaciones o xenobióticos también estimularán la producción de ROS y radicales libres. Las ROS y los radicales libres probablemente reaccionarán con componentes interiores de la célula (por ejemplo, el ADN, las proteínas y los lípidos, etc.) debido a la inestabilidad de los mismos, lo que tiene como resultado el daño oxidativo de las células y tejidos.

20 En general, las enzimas antioxidantes en organismos forman una red interactiva para proteger las células y los tejidos del daño oxidativo. El estrés oxidativo se produce cuando las ROS y los radicales libres exceden la capacidad antioxidante proporcionada por la red interaccionante de las células o tejidos. Se ha comunicado que el estrés oxidativo juega un papel importante en el proceso patológico de la inflamación y las fotolesiones (Simon R. et al (2010), Free radical biology & Medicine, 49:1603-1616; Afaq F. et al. (2006), Experimental Dermatology, 15:678-684).

25 La inflamación es una respuesta protectora de las células o tejidos a los patógenos y a los estímulos externos estresantes. Durante la inflamación, las células o tejidos en el sitio de la lesión estimularán la expresión de genes específicos a través del NF-κB, seguido por un aumento de la expresión de quimiocinas, lo que conduce a la acumulación de leucocitos polinucleares, monocitos, macrófagos y mastocitos en el sitio de la lesión (es decir, infiltración). Los macrófagos reclutados se activarán por lipopolisacáridos (LPS) que se expresan en la superficie de un patógeno. Los macrófagos activados inducirán la expresión de genes proinflamatorios (incluyendo el gen de la ciclooxigenasa-2, COX-2, y el gen de la óxido nítrico sintasa inducible, iNOS) para reforzar la respuesta inflamatoria. Además, los macrófagos activados liberan ROS y radicales libres para destruir a los patógenos. Sin embargo, la respuesta inflamatoria prolongada conduce a estrés oxidativo y daño debido a una acumulación excesiva de ROS y radicales libres, lo que tiene como resultado inflamación crónica y en última instancia potencia la posibilidad de enfermedades crónicas o cáncer.

40 La fotolesión ocurre cuando la piel de un organismo está expuesta a la luz ultravioleta (especialmente, la radiación ultravioleta-B, UV-B), lo que conduce a daño cutáneo. La exposición a la radiación ultravioleta acelerará la acumulación de ROS y radicales libres en las células de la piel, aumentará el estrés oxidativo en las células de la piel e inducirá la expresión de metaloproteinasas de la matriz (MMP), lo que tendrá como resultado fotolesiones oxidativas. Los síntomas de las fotolesiones oxidativas son: telangiectasia, adelgazamiento de la epidermis, reducción de las fibras de colágeno y de las fibras elásticas, sequedad, formación de arrugas, infiltración de células inflamatorias, envejecimiento prematuro de la piel y cambio patológico de la piel.

45 En los últimos años, los agentes fotoquímicos y fotoquimiopreventivos derivados de plantas han demostrado tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y mejorar las fotolesiones. Ejemplos de fotoquímicos incluyen: polifenoles del té verde (GTP), galato de epigallocatequina (EGCG), genisteína, resveratrol, curcumina, apigenina, licopeno, etc. (Adhami V.M. et al (2008), Photochem. Photobiol., 84:489-500). Los fotoquímicos han demostrado ser seguros para aplicación clínica sin efectos secundarios no deseados y han atraído la atención en el campo de la investigación médica.

50 Las plantas del género *Solanum* incluyen *Solanum incanum* L., sinónimo de *Solanum undatum*, *Solanum incanum* Ruiz. & Pav., *Solanum coagulans* Forsskal; manzana amarga), *Solanum indicum*, *Solanum nigrum* (Long kui en chino; hierba mora), *Solanum capsicastrum* (tomatillo de Jerusalén), *Solanum xanthocarpum*, *Solanum melongena*, *Solanum coagulans*, *Solanum tuberosum*, *Solanum sodomium* (tomatitos del diablo), *Solanum tuberosum*, *Solanum aculeastrum*, *Solanum lycocarpum*, *Solanum khasianum*, *Solanum suaveolens*, *Solanum uporo*, *Solanum abutiloides*, *Solanum coccineum*, *Solanum unguiculatum*, *Solanum robustum*, *Solanum anguivi*, *Solanum platanifolium*, *Solanum mammosum*, etc. Se sabe que los alcaloides esteroideos se pueden extraer del género *Solanum* y habitualmente incluyen la solasonina y la solamargina.

60 Los documentos US 7.078.063 B2 y EP 1 508 334 concedidos a los inventores de la presente invención divulgan un extracto hidrosoluble de una planta del género *Solanum*, especialmente *Solanum incanum* L., que incluye al menos 60 % en peso de solasonina y solamargina, y un método para la preparación del extracto hidrosoluble. En la patente de los Estados Unidos anteriormente mencionada, los inventores descubrieron que el extracto hidrosoluble puede inhibir el crecimiento de células tumorales/cancerosas (específicamente células de tumores hepáticos, células de cáncer de pulmón y células de cáncer de mama). En la presente invención, los inventores sorprendentemente descubrieron que

el extracto hidrosoluble cura y/o previene la inflamación y las fotorlesiones.

Por lo tanto, de acuerdo con el primer aspecto, esta invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención y/o tratamiento de las fotorlesiones cutáneas y/o la inflamación de la piel, caracterizándose dicha composición farmacéutica por un extracto hidrosoluble de una planta del género *Solanum*, comprendiendo el extracto hidrosoluble solamargina y solasonina y obteniéndose mediante las etapas (a) a (g) descritas más abajo.

La invención se refiere al uso del extracto hidrosoluble para prevenir y tratar fotorlesiones cutáneas.

La invención se refiere también al uso del extracto hidrosoluble para prevenir y tratar fotorlesiones de la piel.

En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso cosmético de una composición caracterizada por un extracto hidrosoluble de una planta del género *Solanum*, comprendiendo el extracto hidrosoluble solamargina y solasonina y obteniéndose mediante las etapas (a) a (g) descritas más abajo.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferentes de la invención, haciendo referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 es una transferencia Western, que muestra la expresión de COX-2 y en células RAW264.7 después de la respuesta inflamatoria inducida por LPS. Las células del grupo de control normal no se trataron con LPS ni con el extracto hidrosoluble de una planta del género *Solanum*, mientras que las células del grupo de control patológico se trataron con 100 ng/ml de LPS. Los grupos experimentales 1-6 se trataron con diversas concentraciones del extracto hidrosoluble (0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 y 5 μ g/ml) junto con 100 ng/ml de LPS;

La Figura 2 muestra la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) de la piel dorsal de ratones desnudos HRS/J en cada grupo control normal, grupo de control patológico y grupos experimentales 1 y 2 después de 6 semanas de radiación UV-B. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control normal no recibieron ningún tratamiento, incluida la radiación UV-B y el extracto hidrosoluble. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico fueron expuestos a radiación UV-B y no fueron tratados con el extracto hidrosoluble. En el Grupo 1 experimental, Los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con una solución de *Solanum incanum* L que contiene el extracto hidrosoluble. En el Grupo experimental 2, Los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble;

La Figura 3 es una transferencia Western que muestra las expresiones de NF- κ B, COX-2 e iNOS del tejido de piel dorsal de los ratones HRS/J después del período experimental de 60 semanas. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control normal no recibieron ningún tratamiento, incluida la radiación UV-B y el extracto hidrosoluble. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico fueron expuestos a radiación UV-B y no fueron tratados con el extracto hidrosoluble. En el Grupo experimental 2, Los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble;

La Figura 4 muestra una inmunohistoquímica de la expresión de NF- κ B en el tejido de piel dorsal de los ratones desnudos HRS/J al final de las 60 semanas después de la primera vez de la radiación UV-B. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control normal no recibieron ningún tratamiento, incluida la radiación UV-B y el extracto hidrosoluble. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico fueron expuestos a radiación UV-B y no fueron tratados con el extracto hidrosoluble. En el Grupo experimental 2, Los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble;

La Figura 5 muestra una tinción azul de toluidina del tejido de piel dorsal de ratones desnudos HRS/J al final del período experimental de 60 semanas. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control normal no recibieron ningún tratamiento, incluida la radiación UV-B y el extracto hidrosoluble. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico fueron expuestos a radiación UV-B y no fueron tratados con el extracto hidrosoluble. En el Grupo experimental 2, Los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble. Las flechas indican las localizaciones de los mastocitos infiltrados;

La Figura 6 es un diagrama de barras que muestra el número de mastocitos promedio del tejido de la piel dorsal de los ratones desnudos HRS/J en el grupo de control normal, el grupo de control patológico y el grupo experimental 2 después del período de 60 semanas experimental. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control normal no recibieron ningún tratamiento, incluida la radiación UV-B y el extracto hidrosoluble. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico fueron expuestos a radiación UV-B y no fueron tratados con el extracto hidrosoluble. En el Grupo experimental 2, Los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con gel de *Solanum incanum* que contiene el extracto hidrosoluble. indica $p < 0,05$ entre el grupo experimental 2 y el grupo de control normal. "****" indica $p < 0,01$ entre el grupo experimental 2 y el grupo de control patológico. "####" indica $p < 0,001$ entre el grupo de control patológico y el grupo de control normal;

La Figura 7 es una gráfica que muestra el número promedio de tumores en ratones HRS/J desarrollados en varios puntos temporales durante el período experimental de 60 semanas. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico mostraron fotorlesiones inducidas por la radiación UV-B y no fueron tratados con el extracto hidrosoluble. Los ratones desnudos HRS/J del grupo experimental 1 se expusieron a radiación UV y se trataron con una solución de *Solanum incanum* L que contiene el extracto hidrosoluble. En el Grupo experimental 2, Los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble. "" indica $p < 0,05$ entre el grupo experimental 2 y el grupo de control patológico. """" indica

p<0,01 entre el grupo experimental 2 y el grupo de control patológico;

La Figura 8 es una gráfica que muestra el número promedio de tumores en ratones HRS/J desarrollados en varios puntos temporales durante el período experimental de 60 semanas. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico mostraron fotolesiones inducidas por la radiación UV-B y no fueron tratados con el extracto hidrosoluble. Los ratones desnudos HRS/J del grupo experimental 1 se expusieron a radiación UV y se trataron con una solución de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble. Los ratones desnudos HRS/J del grupo experimental 2 se expusieron a radiación UV-B y se trataron con un gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble. "#" indica p<0,05 entre el grupo experimental 1 y el grupo de control patológico. "##" indica p<0,01 entre el grupo experimental 1 y el grupo de control patológico. "###" indica p<0,001 entre el grupo experimental 1 y el grupo de control patológico. "####" indica p<0,01 entre el grupo experimental 2 y el grupo de control patológico; "*****" indica p<0,001 entre el grupo experimental 2 y el grupo de control patológico;

La Figura 9 es un diagrama de barras que muestra el tiempo de recuperación en la prueba del pinchazo en los ratones HSR/J después del período experimental de 60 semanas. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control normal no recibieron ningún tratamiento, incluida la radiación UV-B y el extracto hidrosoluble. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico fueron expuestos a radiación UV-B y no fueron tratados con el extracto hidrosoluble. En el Grupo experimental 2, Los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble. "*****" indica p<0,001 entre el grupo experimental 2 y el grupo de control patológico. "#####" indica p<0,001 entre el grupo de control patológico y el grupo de control normal;

La Figura 10 muestra imágenes de fibras elásticas del tejido de piel dorsal teñido con solución de resorcina-fucsina, Hematoxilina de hierro de Weigert y solución de van Gieson. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico mostraron fotolesiones inducidas por la radiación UV-B y no fueron tratados con el extracto hidrosoluble. En el Grupo experimental 2, Los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble. Las flechas indican las localizaciones de la desnaturalización de la fibra elástica;

La Figura 11 muestra el número promedio de tumores en ratones desnudos HRS/J durante el periodo experimental. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de tretinoína se expusieron a radiación UV-B y se trataron con crema evanescente AIROL. En el grupo del gel de *Solanum incanum* L., los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble;

La Figura 12 es una gráfica que muestra la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) durante el período experimental. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico fueron expuestos a radiación UV-B y no fueron tratados con el extracto hidrosoluble. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de tretinoína se expusieron a radiación UV-B y se trataron con crema evanescente AIROL. En el grupo del gel de *Solanum incanum* L., los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble. "***" indica p<0,05 entre el grupo de tretinoína y el grupo de gel de *Solanum incanum* L.; y

La Figura 13 es una gráfica que muestra el contenido de agua de la piel dorsal de ratones desnudos HRS/J durante el período experimental. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico mostraron fotolesiones inducidas por la radiación UV-B y no fueron tratados con el extracto hidrosoluble. En el grupo de tretinoína, los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con crema evanescente AIROL. En el grupo del gel de *Solanum incanum* L., los ratones desnudos HRS/J se expusieron a radiación UV-B y se trataron con gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble. "*" indica p<0,05 entre el grupo de tretinoína y el grupo de gel de *Solanum incanum* L.

Para los fines de la presente memoria descriptiva, se entenderá claramente que la palabra "que comprende" significa "incluyendo, pero sin limitación" y que las palabras "comprende", "contiene" y variantes de la misma tienen un significado correspondiente.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la inflamación, que incluye un extracto hidrosoluble de una planta del género *Solanum*. El extracto hidrosoluble comprende solamargina y solasonina. Preferiblemente, el extracto hidrosoluble comprende al menos 60 % en peso de solamargina y solasonina, más preferentemente, de 60 % en peso-90 % en peso de solamargina y solasonina.

El procedimiento para preparar el extracto hidrosoluble se ha divulgado en el documento US 7.078.063 B2 e incluye las siguientes etapas:

- (a) someter un material vegetal de una planta del género *Solanum* a un tratamiento de extracción usando una solución acuosa ácida con un valor de pH de 3~5, de modo que se obtiene una solución acuosa;
- (b) ajustar el valor del pH de la solución acuosa obtenida en la etapa (a) hasta un pH 8~ 10 con una base, de modo que se forma un precipitado;
- (c) lavar el precipitado formado en la etapa (b) con agua, seguido de secado, de modo que se obtiene un producto seco;
- (d) mezclar el producto seco obtenida en la etapa (c) con cloroformo, seguido de la adición de una cantidad adecuada de un alcohol al 100 %, de modo que se forma una mezcla de cloroformo-alcohol;
- (e) mezclar el cloroformo-alcohol formado en la etapa (d) con una solución de agua/alcohol que tiene una relación agua/alcohol predeterminada, de modo que se obtiene una mezcla que contiene una capa a base de cloroformo y una capa no a base de cloroformo;

(f) eliminar la capa a base de cloroformo de la mezcla obtenida en la etapa (e), seguido de la adición de una cantidad adecuada de agua; y

(g) obtener un sobrenadante de la mezcla resultante de la etapa (f), seguido de secado del sobrenadante, en el que el producto seco resultante es capaz de disolverse directamente en agua para formar una solución clara y transparente amarillenta.

Preferiblemente, el extracto hidrosoluble de una planta del género *Solanum* se ha obtenido al menos del fruto, raíz, tallo y hoja de la planta del género *Solanum*. La planta del género *Solanum* se ha cortado en un tratamiento preliminar. En una realización preferida de esta invención, el material de la planta se usa en la etapa (a) es el fruto de la planta del género *Solanum*.

Los inventores encontraron que determinados factores pueden afectar al contenido y proporción de solasonina y solamargina en el extracto hidrosoluble obtenido usando el procedimiento anteriormente mencionado. Estos factores incluyen las especies de la planta del género *Solanum* y la parte(s) de la planta utilizadas en el proceso de extracción, así como los tipos de alcohol y base usados. Por lo tanto, un experto en la materia puede preparar un extracto hidrosoluble seleccionando las especies adecuadas de la planta, junto con las condiciones operativas apropiadas.

Preferiblemente, el extracto hidrosoluble se obtiene de una planta del género *Solanum* seleccionado a partir del grupo que consiste en *Solanum* L., *Solanum indicum*, *Solanum nigrum*, *Solanum capsicastrum*, *Solanum xanthocarpum*, *Solanum melongena*, *Solanum coagulans*, *Solanum tunigrum*, *Solanum sodomaeum*, *Solanum tuberosum*, *Solanum aculeastrum*, *Solanum lycocarpum*, *Solanum khasianum*, *Solanum suaveolens*, *Solanum uporo*, *Solanum abutiloides*, *Solanum coccineum*, *Solanum unguiculatum*, *Solanum robustum*, *Solanum anguivi*, *Solanum platanifolium* y *Solanum mammosum*. En una realización preferida de esta invención, el extracto hidrosoluble se obtiene de *Solanum incanum* L.

En experimentos preliminares, Los datos *in vitro* han mostrado que el extracto hidrosoluble del género *Solanum* puede inhibir la respuesta inflamatoria inducida por LPS. También se ha demostrado que, después de tratar los ratones desnudos que presentan inflamación inducida por UV-B con el extracto hidrosoluble del género *Solanum*, la expresión de Nf-kB, COX-2 e iNOS en el tejido cutáneo de los mismos había disminuido considerablemente, junto con una disminución de la infiltración de mastocitos y de la respuesta inflamatoria.

La vía de administración de la composición farmacéutica anteriormente mencionada proporcionada por la invención comprende, pero sin limitación, las vías oral, tópica y parenteral.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención se puede formular en una forma farmacéutica oral usando la tecnología bien conocida por el experto en la materia. Los ejemplos de la dosificación farmacéutica oral incluyen, pero sin limitación: polvo aséptico, comprimido, trocisco, pastillas para chupar, pella, cápsula, polvo o gránulos dispersables, solución, suspensión, emulsión, jarabe, elixir, en suspensión, etc.

La composición farmacéutica de esta invención puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable que es ampliamente utilizado en la tecnología de fabricación de fármacos.

El vehículo farmacéuticamente aceptable comprende uno o más reactivos, que incluyen: disolvente, tampón, emulsionante, agente de suspensión, descomponedor, agente disgregante, agente dispersante, agente aglutinante, excipiente, agente estabilizante, agente quelante, conservante, agente humectante, lubricante, diluyente, agente de retardo de la absorción, liposoma, agente edulcorante, agente aromatizante, agente colorante, etc. La elección y cantidad del vehículo farmacéuticamente aceptable están dentro de la experiencia de los expertos en la materia.

El vehículo farmacéuticamente aceptable comprende uno o más reactivos, que incluyen, por ejemplo, agua, salmuera normal, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución que contiene glucosa, solución acuosa que contiene alcohol (por ejemplo, etanol, propanodiol, glicol, manitol, etc.), aceite (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de ricino, aceite de semilla de algodón, aceite de soja, etc.), glicerol, disolvente orgánico y liposoma. En una realización de esta invención, el disolvente es agua.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede formular en una forma farmacéutica apropiada para la administración tópica usando la tecnología bien conocida por los expertos en la materia, que incluye, pero sin limitación, preparaciones externas, comprimidos efervescentes, supositorios y similares.

En una realización preferida de esta invención, la composición farmacéutica de esta invención se formula en una preparación externa en forma de un gel mezclando el extracto hidrosoluble con una base que es bien conocida y comúnmente utilizada en la técnica.

En la presente invención, la base apropiada puede incluir uno o más de los siguientes aditivos: agua, alcoholes, glicol, hidrocarburos (tales como vaselina líquida y vaselina blanca), ceras (tales como cera de parafina y cera amarilla), agentes conservantes, antioxidantes, tensioactivos, potenciadores de la absorción, agentes estabilizantes, agentes gelificantes (tales como Carbopol®974P, celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa), agentes activos,

humectantes, absorbedores del olor, fragancias, agentes de ajuste de pH, agentes quelantes, emulsionantes, agentes oclusivos, emolientes, espesantes, agentes solubilizantes, potenciadores de la penetración, anti-irritantes, colorantes y propelentes, etc. La elección y cantidad de estos aditivos están dentro de la experiencia de los expertos en la materia.

La dosis y frecuencia de administración de esta composición farmacéutica pueden variar dependiendo de los siguientes factores: la gravedad de la enfermedad a tratar, la ruta de administración y el peso, la edad, la condición física y la respuesta del sujeto a tratar. Por ejemplo, la dosificación diaria de la composición farmacéutica para administración tópica de acuerdo con la presente invención, puede ser de 10-20 mg/cm² del área de la lesión y de una a seis veces al día. La dosificación de esta composición farmacéutica para administración oral puede ser de 1-30 mg/kg, 1-4 veces al día.

El extracto hidrosoluble de la planta del género *Solanum* ha demostrado que alivia el cambio patológico de la piel inducido por las fotolesiones cutáneas inducidas por radiación UV-B en ratones desnudos. Además, puede mejorar eficazmente la elasticidad de la piel y la elastosis solar, manteniendo al mismo tiempo la capacidad de retención de la humedad.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de las fotolesiones cutáneas, que comprende el extracto hidrosoluble de una planta del género *Solanum* como se ha descrito anteriormente.

En la presente invención, la expresión "fotolesión cutánea" indica el daño en la piel causado por la exposición de la piel a la luz solar o a luz ultravioleta (especialmente UV-B). La fotolesión cutánea comprende, pero sin limitación: adelgazamiento de la piel, atrofia de la piel, reducción de las fibras de colágeno y de las fibras elásticas, elastosis, pérdida de elasticidad de la piel, sequedad, formación de arrugas, infiltración de células inflamatorias, envejecimiento prematuro de la piel, cambio vascular (como eritema difuso, equimosis o telangiectasia), cambio pigmentario (como lentiginos, pecas, hipopigmentación o hiperpigmentación), comedón, quistes y cambio patológico de la piel.

De acuerdo con la presente invención, la ruta de administración, la dosificación y el vehículo farmacéuticamente aceptable son similares a los usados en la composición farmacéutica para prevenir y tratar la inflamación. En una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se formula en forma tópica para la administración a la piel.

Debido a la prevención/protección de la fotolesión cutánea del extracto hidrosoluble, se puede predecir que el extracto hidrosoluble se pueda usar como un componente cosmético para preparar una composición cosmética.

Por lo tanto, la invención proporciona el uso cosmético de una composición caracterizada por el extracto hidrosoluble de una planta del género *Solanum* como se ha descrito anteriormente,

Las composiciones cosméticas pueden tener un efecto fotoprotector.

En la presente invención, el término "fotoprotector" indica bloquear o aliviar los efectos adversos clínicos, histológicos e inmunológicos causados por el sol o la radiación ultravioleta. Estos efectos incluyen reacciones agudas (tales como eritema e inflamación) y efectos crónicos (tales como elastosis y formación de arrugas).

De acuerdo con la presente invención, las composiciones cosméticas pueden comprender además adyuvantes cosméticamente aceptables que se emplean ampliamente en la tecnología de fabricación de cosméticos.

El adyuvante aceptable comprende uno o más reactivos, que incluyen disolvente, agente gelificante, agentes de activación, conservantes, antioxidantes, agente filtrante, agente quelante, tensioactivos, agente colorante, agentes espesantes, carga, fragancia y absorbente del olor. La elección y cantidad de estos aditivos están dentro de la experiencia de los expertos en la materia.

La composición cosmética para su uso de acuerdo con la invención se puede preparar usando la tecnología bien conocida por un experto en la materia en forma de un producto para el cuidado de la piel, cuidado del cabello o maquillaje. La forma incluye, pero sin limitación, solución acuosa, emulsión, gel, ungüento, crema, máscara, parche, polvo, aerosol, pulverización, loción, protector solar y otros productos limpiadores corporales.

La composición cosmética para su uso de acuerdo con la invención se puede usar con los siguientes agentes: agentes blanqueadores, humectantes, bactericidas, absorbentes de ultravioleta, agente anti-acné, antipruríticos, agentes antihiperqueratolíticos, agentes antipsoriásicos, antiedad, agentes antiarrugas, agentes antiborreicos, agentes autobronceadores y agentes para la cicatrización de heridas. La elección y cantidad de estos agentes están dentro de la experiencia de los expertos en la materia.

Materiales experimentales:

1. Preparaciones de extracto hidrosoluble de *Solanum incanum* L. y de una solución de *Solanum incanum* L.

que contiene el extracto hidrosoluble:

El extracto hidrosoluble de *Solanum incanum* L. se preparó basándose en el procedimiento divulgado en el Ejemplo 1 de la patente divulgada en el documento US 7.078.063 B2. Específicamente, se trituraron 500 g de fruto maduro de *Solanum incanum* L. después de la adición de 1000 ml de agua pura. A la mezcla acuosa resultante, se añadieron gota a gota 99,5 % de ácido acético para ajustar el valor del pH hasta 4,0, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. Se obtuvo un sobrenadante por centrifugación de la mezcla acuosa y se añadió gota a gota a la misma una solución básica de NH₄OH 33 % para ajustar el valor del pH del sobrenadante hasta 9,0, formándose un precipitado. El precipitado se obtuvo centrifugando a 4.500 rpm (Beckman Coulter, Avanti J-25, Rotor JA-14) y la solución básica residual presente en el mismo se eliminó lavando el precipitado con agua, seguido de centrifugación a 4.500 rpm. El precipitado así obtenido se suspendió en agua destilada y se sometió a liofilización (Virtis, Freezemobile 12ES) para obtener 5 g de polvo seco.

Se disolvieron 2 g del polvo seco en 50 ml de cloroformo de calidad reactivo, seguido de la adición de 40 ml de metanol 100 % y se agitó para formar una suspensión acuosa. Se obtuvo un sobrenadante por centrifugación a 4.500 rpm o filtración. Se añadieron 70 ml de una solución de metanol:agua (1:1) al sobrenadante y se mezcló bien. La mezcla obtenida se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante resultante se extrajo y se añadieron 120 ml de agua destilada al mismo y se agitó bien. Paralelamente, el sobrenadante se volvió turbio. El sobrenadante se centrifugó adicionalmente a 12.000 rpm durante 10 min para eliminar el precipitado. El sobrenadante resultante se sometió a descompresión concentrando a presión reducida a 55 °C para eliminar el metanol, seguido de liofilización para obtener un polvo seco del extracto hidrosoluble.

El extracto hidrosoluble se disolvió en agua esterilizada para obtener una solución de *Solanum incanum* L. para su uso posterior en los experimentos descritos a continuación.

2. Preparación de un gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble:

Se disolvieron 4 g de Carbopol®974P, que se usó como un agente gelificante y que está comercializado por Lubrizol Advanced Materials, Inc., KY 40258, EE.UU., en 50 g de agua pura, seguido de la adición secuencial de 30 g de propilenglicol y 7 g del polvo seco del extracto hidrosoluble obtenido de la sección de "1. Preparaciones de extracto hidrosoluble de *Solanum incanum* L. y de una solución de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble" de "Materiales experimentales" y se mezclan bien. La mezcla se calentó en un vaso calefactor a una temperatura de 50 °C-60 °C durante 20 minutos, seguido de enfriamiento a temperatura ambiente. A la mezcla enfriada se añadió trietanolamina para ajustar el pH hasta 7,0±0,5. Posteriormente, se añadió agua hasta que el peso total de la mezcla alcanzó 100 g, obteniéndose así un gel que contiene 7 % (p/p) del extracto hidrosoluble (en lo sucesivo denominado gel de *Solanum incanum* L.).

3. Modelo animal

Los ratones desnudos HRS/J (6-8 semanas de edad, peso corporal 20-22 g) se adquirieron en Jackson Laboratory (Bar Harbor, EE.UU.). Los ratones se mantuvieron en una habitación con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas, temperaturas de 21-22 °C, y 30-70 % de humedad. Los ratones tenían acceso continuo a la comida y al agua. Todos los experimentos animales se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (NIH).

Métodos generales:**1. Análisis de los productos proteicos:**

Se usó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y la transferencia Western para el análisis de proteínas en esta invención. El aparato y los reactivos para la SDS-PAGE y la transferencia Western son los siguientes:

- Para el análisis SDS-PAGE se utilizó un sistema de electroforesis vertical (Hoefer SE600, GE Healthcare).
- Para la transferencia de proteínas se utilizó una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore) y sistemas para transferencia semiseca (Hoefer TE70X, GE Healthcare).
- Los anticuerpos primarios y secundarios usados en el método de transferencia Western se enumeran en la Tabla 1.
- Las proteínas se visualizaron usando tinción de quimioluminiscencia usando el Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, N.º de cat. WBKLS0500), seguido por detección en películas de autorradiografía (Kodak Biomax, Kodak, N.º de cat 1788207).

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios usados en el análisis de transferencia Western

Proteína diana	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
COX-2	Anticuerpo monoclonal anti-COX-2 de ratón (BD Bioscience. N.º de cat 610203)	Anticuerpo anti-IgG de ratón de oveja-peroxidasa de rábano picante (HRP) (Amersham. N.º de cat NA931)
NF-κB	Anticuerpo monoclonal anti-NF-κB de conejo (Abcam. N.º de cat Ab7970)	Anticuerpo anti-IgG de conejo-HRP (Amersham. N.º de cat NA934)
iNOS	Anticuerpo policlonal anti-iNOS de conejo (Santa Cruz. N.º de cat Sc-651)	Anticuerpo anti-IgG de conejo de burro-HRP
β-actina	Anticuerpo monoclonal anti-β-actina de ratón (Sigma. N.º de cat A5441)	Anticuerpo anti-IgG de ratón de oveja-HRP
GAPDH	Anticuerpo monoclonal anti-GAPDH de ratón (Chemicon. N.º de cat Mab374)	Anticuerpo anti-IgG de ratón de oveja-HRP

2. Inducción de la inflamación y la fotolesión:

- 5 La piel dorsal de cada ratón HRS/J se expuso a radiación UV-B tres veces a la semana durante 14 semanas para inducir una respuesta inflamatoria y fotolesiones. La radiación ultravioleta UV-B se aplicó utilizando un reticulador ultravioleta BLX-312 (BIO-LINK, Vilber Lourmat, Francia), que está equipado con una lámpara UV-B 6x8W T-8M (312 nm). La dosificación única de la radiación UV-B para cada exposición, la dosificación UV-B para una semana (dosis/sem) y la dosis acumulada se enumeran en la Tabla 2.

10

Tabla 2.

Punto temporal experimental (sem)	Dosificación UV-B única (mJ/cm ²)	Dosificación/sem (mJ/cm ²)	Dosificación acumulada (mJ/cm ²)
1	36	108	108
2	54	162	270
3	72	216	486
4	90	270	765
5	108	324	1080
6	126	378	1458
7	144	432	1890
8	162	486	2376
9	180	540	2916
10	216	594	3510
11	216	648	4158
12	216	648	4806
13	216	648	5454
14	216	648	6102

3. Corte de tejido:

- 15 Los tejidos (cosechados a temperatura ambiente) se fijaron en paraformaldehído 4 % en PBS durante al menos 12 horas, seguido de la deshidratación en etanol. Los tejidos deshidratados se embebieron en parafina y se cortaron para obtener cortes longitudinales.

4. Análisis estadístico:

20

Los resultados se presentan como valores medios ± error típico de la media (± ETM). Todos los análisis de los datos estadísticos se realizaron con la prueba t de Student (2 colas). La p<0,05 se consideró estadísticamente significativa.

Ejemplo 1: Evaluación del efecto antiinflamatorio *in vitro* del extracto hidrosoluble de *Solanum incanum* L.

25

La línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 que se sometió a inflamación inducida por lipopolisacáridos (LPS) se usó para determinar el efecto antiinflamatorio del extracto hidrosoluble de *Solanum incanum* L.

30

Las células RAW264.7 (adquiridas de la colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC, TIB-71) sembraron con una densidad de 1x10⁶ células/pocillo (placa de 6 pocillos) en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (HyClone SH 30022.01, Logan, Utah, EE. UU.) con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, L-glutamina 4 mM y glucosa 4,5 g/l (sin

piruvato de sodio) y se incubaron a 37 °C, en una estufa incubadora con CO₂ al 5 %. Las células se dividieron en tres grupos: un grupo de control normal, un grupo de control patológico y grupos experimentales (grupo experimental 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Después de 72 h de incubación, el grupo de control patológico se cambió para su incubación en medio DMEM fresco que contiene 100 ng/ml de LPS (*Escherichia coli* serotipo 0111:B4, Sigma), y los grupos experimentales se incubaron en medio DMEM fresco que contiene 100 ng/ml de LPS y diferentes concentraciones de los extractos hidrosolubles obtenidos de la sección de "1. Preparaciones de extracto hidrosoluble de *Solanum incanum* L. y de una solución de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble" en "Materiales experimentales". Las concentraciones de los extractos hidrosolubles para los grupos experimentales 1, 2, 3, 4, 5 y 6 fueron respectivamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 y 5 µg/ml. El grupo de control normal se incubó en DMEM con SFB al 10 %, L-glutamina 4 mM y glucosa 4,5 g/l (sin piruvato de sodio). Después de 24 horas de incubación (a 37 °C, en una estufa incubadora con CO₂ al 5 %), el medio de cada pocillo se eliminó añadiendo 100 µl de reactivo T-PER (adquirido en PIERCE) y mezclando para obtener una mezcla celular. La mezcla celular se colocó en un tubo de centrifugación y se agitó durante 5 min seguida de enfriamiento en hielo durante 30 min. Posteriormente, la mezcla celular se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C y se recogió un sobrenadante como una muestra de proteínas para su posterior análisis.

La muestra de proteínas resultante se sometió a un análisis de transferencia Western de COX-2 usando el método descrito en la sección de "1. Análisis de los productos proteicos" en "Métodos generales". Se usó β actina como control interno.

La Figura 1 es una transferencia Western que muestra la expresión de COX-2 en células RAW264.7. Como se muestra en la Figura 1, la expresión de COX-2 estaba notablemente aumentada en el grupo de control patológico en comparación con el grupo de control normal, lo que indica una inducción con éxito de la inflamación por LPS en células RAW264.7. Se observó una disminución de la expresión de COX-2 en el grupo experimental 1-6 en comparación con el grupo de control patológico y esta expresión disminuida era más obvia cuando se añadía una mayor concentración de extracto hidrosoluble. Estos datos demuestran que el extracto hidrosoluble de *Solanum incanum* L. puede inhibir la inflamación inducida por LPS *in vitro*, y que el efecto del extracto hidrosoluble sobre la respuesta antiinflamatoria depende de la dosis.

Ejemplo 2: Evaluación de los efectos terapéuticos de la solución de *Solanum incanum* L. y del gel de *Solanum incanum* L. sobre los ratones desnudos con inflamación inducida por radiación UV-B

Los ratones desnudos HRS/J se agruparon aleatoriamente en grupo de control normal, grupo de control patológico y dos grupos experimentales (es decir, grupo experimental 1 y 2) (n=4/grupo), los ratones desnudos HRS/J del grupo de control normal no recibieron radiación UV-B. En los ratones del grupo de control patológico y en dos grupos experimentales se indujo la inflamación usando el procedimiento como se describe en la sección de "2. Inducción de la inflamación y la fotolesión" en "Métodos generales".

Desde el inicio de la radiación UV-B, a los ratones HRS/J del grupo experimental 1 se les administró por vía oral solución de *Solanum incanum* L., solución que se preparó como se describe en la sección de "1. Preparaciones de extracto hidrosoluble de *Solanum incanum* L. y de una solución de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble" en "Materiales experimentales". A estos ratones se administró la solución de *Solanum incanum* L. una vez al día (1500 mg/kg), 7 veces a la semana, durante un periodo de 14 semanas (sem) y se observaron continuamente durante 60 semanas (es decir, un periodo experimental de 60 semanas). Se aplicó en la piel dorsal expuesta a radiación UV-B de cada uno de los ratones desnudos HRS/J del grupo experimental 2, el gel de *Solanum incanum* L. gel obtenido de la sección de "2. Preparación de un gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble en "Materiales experimentales". El gel se aplicó una vez al día (dosificación: 10-20 mg de gel por cm²), 5 veces a la semana, durante un período de 14 sem y se observó durante 60 sem. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control normal y del grupo de control patológico no se trataron ni con la solución de *Solanum incanum* L. ni con el gel de *Solanum incanum* L.

Después de 6 semanas de radiación UV-B, los ratones desnudos HRS/J se analizaron según los apartados A y B enumerados más abajo. Además, usando unas tijeras quirúrgicas se recogieron tejidos de la piel dorsal de los ratones del grupo de control normal, del grupo de control patológico y del grupo experimental 2 después del periodo experimental de 60 semanas. Estos tejidos se analizaron según los apartados C a E enumerados más abajo.

A. Diagnóstico de signos clínicos:

Los ratones desnudos HRS/J se observaron para detectar signos de inflamación, por ejemplo, picor, enrojecimiento, etc. después de 6 semanas de radiación UV-B.

B. Análisis de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL)

Después de 6 semanas de radiación UV-B, la TEWL se evaluó en la piel dorsal de cada ratón desnudo HRS/J de cada grupo usando un evaporímetro (Tewameter TM 201R, Courage & Khazaka, Colonia, Alemania).

C. Análisis de transferencia Western de NF- κ B, COX-2 e iNOS

Se añadieron a 0,5 g de tejido de piel reactivo de extracción de la proteína tisular T-PER (Thermo Scientific, N.º de cat. 78510), seguido por disrupción del tejido con un homogeneizador (adquirido en Biospec Products). El producto bien homogeneizado se centrifugó a 15.000 rpm y 4 °C durante 10 horas. El sobrenadante se recogió para el análisis de proteínas.

La proteína aislada se usó adicionalmente para detectar NF- κ B, COX-2 e iNOS mediante análisis de transferencia Western de acuerdo con el procedimiento expuesto en la sección de "1. Análisis de los productos proteicos" en "Métodos generales". Como control interno se usó GAPDH.

D. Tinción de inmunohistoquímica de NF- κ B

Se hicieron cortes de tejido de piel de un espesor de 6 μ m usando el procedimiento expuesto en la sección de "3. Corte de tejido" en "Métodos generales". Los cortes de tejido se sometieron a tinción de inmunohistoquímica usando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo conjugado con biotina (DarkoCytomation). Los tejidos teñidos se examinaron en un microscopio óptico (Olympus BX51, Japón) con un aumento de 100 a 400X y se fotografiaron usando una cámara digital (Olympus DP50, Japón).

E. Tinción de histoquímica de mastocitos

Se hicieron cortes de tejido de piel de un espesor de 6 μ m usando el procedimiento expuesto en la sección de "3. Corte de tejido" en "Métodos generales". Los cortes de tejido se sometieron a tinción de histoquímica con azul de toluidina (Sigma, N.º de cat. T3260). Los cortes de tejido teñidos se examinaron en un microscopio óptico con un aumento de 100 a 400X y se fotografiaron usando una cámara digital (Olympus DP50, Japón). La cuantificación del número de mastocitos se realizó aleatoriamente seleccionando 5 cortes de tejido y contando aleatoriamente 10 campos de observación en cada uno de los cortes de tejido. Los datos se muestran como la media $\pm$ ETM ($p < 0,05$ estadísticamente significativa).

A. Diagnóstico de signos clínicos

Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico mostraron síntomas de inflamación en comparación con el grupo de control normal, lo que sugiere que la radiación UV-B indujo con éxito la respuesta inflamatoria en ratones desnudos HRS/J. Los grupos experimentales 1 y 2 mostraron una reducción significativa de la respuesta inflamatoria en comparación con el grupo de control patológico. Estos datos sugieren que la solución de *Solanum incanum* L. y el gel de *Solanum incanum* tienen efectos antiinflamatorios.

B. Análisis de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL)

La Figura 2 muestra un gráfico que muestra los resultados de la (TEWL de la piel dorsal de ratones desnudos HRS/J en el grupo de control normal, el grupo patológico y los grupos experimentales 1 y 2. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico mostraron un nivel elevado de TEWL en comparación con el grupo de control normal. Esto indica que la radiación UV-B indujo la TEWL en ratones desnudos HRS/J y que dañó la función de barrera del estrato córneo. Los ratones desnudos HRS/J de los grupos experimentales 1 y 2 mostraron una disminución notable de la TEWL en comparación con el grupo de control patológico. En definitiva, estos datos sugieren que la solución de *Solanum incanum* L. y el gel de *Solanum incanum* L. pueden mejorar el daño en el estrato córneo y la inflamación causada por la radiación UV-B.

C. Análisis de transferencia Western de NF- κ B, COX-2 e iNOS

La Figura 3 es un análisis de transferencia Western de NF- κ B, COX-2 e iNOS del tejido de la piel dorsal de ratones desnudos HRS/J en el grupo de control normal, el grupo patológico y el grupo experimental 2. Los tejidos de la piel del grupo de control patológico mostraron un aumento de la expresión de NF- κ B, COX-2 e iNOS en comparación con el grupo de control normal, lo que sugiere que la radiación UV-B indujo una respuesta inflamatoria en ratones desnudos HRS/J. Se observó una reducción significativa de los niveles de NF- κ B, COX-2 e iNOS en el grupo experimental 2 en comparación con el grupo de control patológico. En definitiva, estos datos sugieren que el gel de *Solanum incanum* L. tiene efectos antiinflamatorios.

D. Tinción de inmunohistoquímica de NF- κ B

La Figura 4 muestra una tinción de inmunohistoquímica de la expresión de NF- κ B en el tejido de piel dorsal obtenido de ratones desnudos HRS/J. Como se muestra en la Figura 4, el grupo de control patológico mostró un aumento del nivel de expresión de NF- κ B en comparación con el grupo de control normal, lo que sugiere que la radiación UV-B induce una respuesta inflamatoria en ratones desnudos HRS/J. Cuando se aplicaba gel de *Solanum incanum* L. a los ratones desnudos HRS/J, como en el Grupo experimental 2, la expresión de NF- κ B mostraba una disminución significativa en comparación con el grupo de control patológico. En definitiva, estos datos sugieren que el gel de

Solanum incanum L. de la presente invención tiene efectos antiinflamatorios.

E. Tinción de histoquímica de mastocitos

5 La Figura 5 muestra una tinción de inmunohistoquímica de mastocitos obtenidos del tejido de piel dorsal de ratones desnudos HRS/J. Como se muestra en la Fig. 5, la tinción de azul de toluidina reveló una infiltración masiva de mastocitos en el tejido de piel dorsal del grupo de control patológico. Este fenómeno no era claramente visible en el grupo de control normal. Apparently, la infiltración de mastocitos estaba significativamente reducida en el grupo experimental 2 en comparación con el grupo de control patológico.

10 Una comparación del número de mastocitos en cada uno del grupo de control normal, el grupo patológico y el grupo experimental 2 se muestra en la Figura 6. El grupo experimental 2 mostró una reducción significativa del número de mastocitos en comparación con el grupo de control patológico. Estos datos sugieren que el gel de *Solanum incanum* L. puede mejorar el efecto inflamatorio inducido por la radiación UV-B en ratones desnudos HRS/J.

15 **Ejemplo 3: Evaluación de los efectos terapéuticos de la solución de *Solanum incanum* L. y del gel de *Solanum incanum* L. sobre los ratones desnudos con fotolesión inducida por UV-B.**

20 Los ratones desnudos HRS/J se agruparon aleatoriamente en grupo de control normal, grupo de control patológico y dos grupos experimentales (es decir, grupos experimentales 1 y 2) (n=4/grupo). Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control normal no recibieron ningún tratamiento de radiación UV-B. La inflamación se indujo en ratones del grupo de control patológico y de dos grupos experimentales como se describe en la sección de "2. Inducción de la inflamación y la fotolesión" en "Métodos generales".

25 Desde el inicio de la radiación UV-B, a los ratones HRS/J del grupo experimental 1 se les administró por vía oral solución de *Solanum incanum* L., solución que se preparó como se describe en la sección de "1. Preparaciones de extracto hidrosoluble de *Solanum incanum* L. y de una solución de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble" en "Materiales experimentales". A estos ratones se administró la solución de *Solanum incanum* L. una vez al día (1500 mg/kg), 7 veces a la semana, durante un periodo de 14 semanas y se observaron continuamente durante 60 semanas (es decir, un periodo experimental de 60 semanas). En el Grupo experimental 2, el gel de *Solanum incanum* L. preparado de acuerdo con la sección de "2. Preparación de un gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble" en "Materiales experimentales" se aplicó a la piel dorsal de los ratones sometidos a radiación UV-B. El gel se aplicó una vez al día (dosificación: 10-20 mg de gel por cm²), 5 veces a la semana, durante un periodo de 14 semanas y se observó durante 60 semanas. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control normal y del grupo de control patológico no se trataron ni con la solución de *Solanum incanum* L. ni con el gel de *Solanum incanum* L.

40 Al final de las semanas 26, 35, 38, 41, 52, 56 y 60 durante el período experimental de 60 semanas, la piel dorsal de los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico y de los grupos experimentales 1 y 2 se sometieron a los análisis del apartado A (véase más adelante). Además, después del periodo experimental de 60 semanas, la piel dorsal obtenida de los ratones desnudos HRS/J en el grupo de control normal, el grupo de control patológico y el grupo experimental 2, se sometieron a los análisis del apartado B como se describe más adelante. Los tejidos de la piel dorsal de los ratones del grupo de control patológico y del grupo experimental 2 se obtuvieron usando unas tijeras quirúrgicas y se sometieron a los análisis del apartado C como se describe más adelante.

45 A. Análisis de la formación de tumor cutáneo

El número de tumores en la piel dorsal de ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico y de los grupos experimentales 1 y 2 se observaron a simple vista. El tamaño del tumor se registró usando un calibre digital (Mitutoyo, NTD15P-6"CX). Los datos se muestran como la media $\pm$ ETM ($p < 0,05$ es estadísticamente significativa).

50

B. Evaluación de la elasticidad de la piel

La elasticidad de la piel se evaluó de acuerdo con la prueba del pellizco que se menciona en K. Tsukahara et al (2005), Biolo. Pharm. Bull., 28 (12):2302-2307. En resumen, los ratones desnudos HRS/J del grupo de control normal, del grupo de control patológico y del grupo experimental 2 se colocaron en una plataforma. Se dio un pellizco estirando hacia arriba lo máximo posible la piel dorsal de la línea media del cuerpo del ratón (sin levantar al ratón) y después se liberó. Se midió el tiempo de recuperación de la piel pellizcada hasta que recuperó su estado original.

60 C. Tinción histoquímica de la fibra elástica

Después del periodo experimental de 60 sem, los tejidos de la piel obtenidos de los ratones desnudos HRS/J en el grupo de control patológico y en el grupo experimental 2 se cortaron en cortes de 6 μ m de espesor usando el procedimiento expuesto en la sección de "3. Corte de tejido" en "Métodos generales". Los cortes de tejido se tiñeron con una solución de resorcina-fucsina, hematoxilina de hierro de Weigert y solución de van Gieson (todas ellas adquiridas en Muto Pure Chemicals Co., Ltd). Los tejidos teñidos se examinaron en un microscopio óptico con un

65

aumento de 100 a 400X y se fotografiaron usando una cámara digital (Olympus DP50 Japón).

A. Análisis de la formación de tumor cutáneo

- 5 El número de tumores a lo largo del período experimental de 60 semanas se muestran en la Figura 7. La medición del tamaño tumoral a lo largo del período experimental de 60 semanas se muestra en la Figura 8.

10 Como se muestra en la Figura 7 y 8, en la semana 38, la piel dorsal de los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico mostró una aceleración del desarrollo tumoral. Por el contrario, en los grupos experimentales 1 y 2 se observó un aumento más lento del número y tamaño de los tumores durante el período experimental de 60 semanas. Estos datos sugieren que la solución de *Solanum incanum* L. y el gel de *Solanum incanum* L. puede mejorar las fotolesiones causadas por la radiación UV-B y aliviar el cambio patológico causado por las fotolesiones.

B. Evaluación de la elasticidad de la piel

15 La prueba del pellizco se realizó después del periodo experimental de 60 semanas en los ratones desnudos HRS/J del grupo de control normal, el control patológico y el grupo experimental 2. Como se muestra en la Figura 9, el grupo de control patológico mostró una elasticidad disminuida en comparación con el grupo de control normal ya que se requiere un tiempo de recuperación más largo en el grupo de control patológico; lo que sugiere que la radiación UV-B induce fotolesión en ratones desnudos HRS/J. Cuando se aplicaba gel de *Solanum incanum* L. a la piel dorsal de los ratones desnudos del grupo experimental 2, la elasticidad de la piel aumentaba enormemente en comparación con el grupo de control patológico. Los datos de estos experimentos sugieren que el gel de *Solanum incanum* L. puede aliviar las fotolesiones causadas por la radiación UV-B y mejorar la elasticidad de la piel.

25 C. Tinción histoquímica de la fibra elástica

30 Como se muestra en la Figura 10, la ocurrencia de desnaturalización de la fibra elástica estaba marcadamente aumentada en el grupo de control patológico. Por otro lado, Cuando se aplicaba gel de *Solanum incanum* L. a la piel dorsal de los ratones desnudos del grupo experimental 2, había menos ocurrencia de desnaturalización de la fibra elástica y las fibras permanecieron largas e intactas. Los datos de estos experimentos sugieren que el gel de *Solanum incanum* L. de la presente invención puede aliviar las fotolesiones causadas por la exposición a la radiación UV-B y mejorar la elastosis solar.

35 En definitiva, los datos de los experimentos anteriores, respaldan que el extracto hidrosoluble de *Solanum incanum* L. puede prevenir las fotolesiones y mejorar los cambios patológicos en la piel causados por las fotolesiones.

Ejemplo 4: Comparación del efecto del gel de *Solanum incanum* L. y de la tretinoína sobre la prevención de las fotolesiones inducidas por radiación UV-B.

40 Los ratones desnudos HRS/J se agruparon aleatoriamente en grupo de control patológico, grupo de tretinoína y grupo de gel de *Solanum incanum* L. (n=5/grupo). La inducción de fotolesiones en los ratones desnudos HRS/J de cada grupo se realizó de acuerdo con la sección de "2. Inducción de la inflamación y la fotolesión" en "Métodos generales".

45 Desde el inicio de la radiación UV-B, se aplicó a los ratones HRS/J del grupo de tretinoína una crema evanescente AIROL (que contiene tretinoína al 0,05 %, un componente activo convencional para el tratamiento de las fotolesiones, dosificación tópica: de 10 a 20 mg de crema evanescente AIROL por cm²). La crema se aplicó una vez al día, 5 veces a la semana, durante 14 semanas y se observó de forma continuada durante 35 semanas (es decir, período experimental de 35 semanas). Se aplicó a la piel dorsal de los ratones desnudos HRS/J del grupo de gel de *Solanum incanum* L. el gel de *Solanum incanum* L. obtenido de la sección de "2. Preparación de un gel de *Solanum incanum* L. que contiene el extracto hidrosoluble en "Materiales experimentales". El gel se aplicó una vez al día (dosificación: 10-20 mg de gel/cm²), 5 veces a la semana, durante un período de 14 semanas y se observó durante 35 semanas. Los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico no fueron tratados con el extracto hidrosoluble.

55 El número de tumores en la piel dorsal de los ratones del grupo de tretinoína y del gel de *Solanum incanum* L. se cuantificó en la semana 0 (es decir, antes de la exposición a radiación UV-B), y al final de las semanas 2, 7, 12, 17, 22, 27 y 32 durante el período experimental de 35 semanas basado en el método mencionado en el Apartado A (Análisis de la formación de tumores de la piel) del Ejemplo 3. Además, los ratones desnudos HRS/J del grupo de control patológico, del grupo de tretinoína y del grupo de gel de *Solanum incanum* L. se sometieron a análisis como se ha mencionado en el apartado B (Análisis de la pérdida de agua transepidérmica) del Ejemplo 2 y del siguiente apartado A en la semana 0 y al final de las semanas 5, 10, 15, 20, 25 y 30 durante el período experimental de 35 semanas.

A. Examen del contenido de agua en la piel

65 La determinación del contenido de agua en la piel se examinó usando un evaporímetro (Tewameter TM 201R, Courage & Khazaka, Colonia, Alemania).

(1) Análisis de la formación de tumores cutáneos

Como se muestra en la Fig. 11, en la semana 17, el grupo de tretinoína mostró un aumento drástico del número promedio de tumores. Por el contrario, los ratones desnudos HRS/J del grupo de gel de *Solanum incanum* L. mostraron un lento aumento del número promedio de tumores. Estos datos sugieren que el gel de *Solanum incanum* L. de la presente invención puede mejorar más eficazmente la fotolesión causada por la radiación UV-B en comparación con el grupo de tretinoína y aliviar los cambios patológicos de la piel.

(2) Evaluación de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL)

Como se muestra en la Figura 12, durante el período experimental de 35 semanas, la tasa de TEWL, era menor en el grupo de gel de *Solanum incanum* L. en comparación con el grupo patológico y de tretinoína. Específicamente, al final de las semanas 20, 25 y 30 durante el período experimental de 35 semanas, había una diferencia estadísticamente significativa en la TEWL entre el grupo de control patológico y el grupo de gel de *Solanum incanum* L. ($p < 0,05$). Estos datos sugieren que el gel de *Solanum incanum* de la presente invención puede aliviar eficazmente las fotolesiones inducidas por la radiación UV-B y mejorar el daño en el estrato córneo causado por las fotolesiones.

(3) Evaluación del contenido de agua en la piel

El contenido de agua en la piel dorsal de ratones desnudos HRS/J de cada grupo (control patológico, tretinoína y gel de *Solanum incanum* L.) se determinó en varios puntos temporales a lo largo del período experimental de 35 semanas. Como se muestra en la Fig. 13, los ratones tratados con el gel de *Solanum incanum* L. tenían un mayor contenido de agua en la piel en comparación con el grupo de control patológico y el grupo de tretinoína. Específicamente, al final del de 25 semanas, los ratones tratados con el gel de *Solanum incanum* L. tenían un contenido de agua estadísticamente significativo mayor en comparación con el grupo de control patológico el grupo de tretinoína. Estos datos sugieren que el gel de *Solanum incanum* L. de esta invención es más eficaz para aliviar las fotolesiones causadas por la radiación UV-B y mejorar la pérdida de agua transepidérmica que el grupo de tratamiento con tretinoína.

En definitiva, el extracto hidrosoluble de la presente invención ha demostrado la prevención de las fotolesiones, la mejora de los cambios patológicos causados por las fotolesiones y el mantenimiento de la capacidad de retención de la humedad más eficazmente que lo que se usa frecuentemente para tratar y prevenir las fotolesiones (como la tretinoína).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención y/o tratamiento de las fotolesiones cutáneas y/o la inflamación de la piel, **caracterizándose** dicha composición farmacéutica por un extracto hidrosoluble de una planta del género *Solanum*, comprendiendo dicho extracto hidrosoluble solamargina y solasonina y pudiéndose obtener dicho extracto hidrosoluble mediante las siguientes etapas:
 - (a) someter un material vegetal de una planta del género *Solanum* a un tratamiento de extracción usando una solución acuosa ácida con un valor de pH de 3~5, de modo que se obtiene una solución acuosa;
 - (b) ajustar el valor del pH de la solución acuosa obtenida en la etapa (a) hasta un pH 8~10 con una base, de modo que se forma un precipitado;
 - (c) lavar el precipitado formado en la etapa (b) con agua, seguido de secado, de modo que se obtiene un producto seco;
 - (d) mezclar el producto seco obtenida en la etapa (c) con cloroformo, seguido de la adición de una cantidad adecuada de un alcohol al 100 %, de modo que se forma una mezcla de cloroformo-alcohol;
 - (e) mezclar el cloroformo-alcohol formado en la etapa (d) con una solución de agua/alcohol que tiene una relación agua/alcohol predeterminada, de modo que se obtiene una mezcla que contiene una capa a base de cloroformo y una capa no a base de cloroformo;
 - (f) eliminar la capa a base de cloroformo de la mezcla obtenida en la etapa (e), seguido de la adición de una cantidad adecuada de agua; y
 - (g) obtener un sobrenadante de la mezcla resultante de la etapa (f), seguido de secado del sobrenadante, en el que el producto seco resultante es capaz de disolverse directamente en agua para formar una solución clara y transparente amarillenta.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 para su uso tal como se define en la reivindicación 1, que además se **caracteriza por que** dicho extracto hidrosoluble comprende al menos 60 % en peso de solamargina y solasonina.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 para su uso tal como se define en la reivindicación 1, que además se **caracteriza por que** dicho extracto hidrosoluble comprende de 60-90 % en peso de solamargina y solasonina.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, 2 o 3 para su uso tal como se define en la reivindicación 1, que se aplica en una forma farmacéutica oral.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, 2 o 3 para su uso tal como se define en la reivindicación 1, que se aplica en una forma farmacéutica tópica.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en la prevención y/o tratamiento de las fotolesiones cutáneas.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 para su uso tal como se define en la reivindicación 6, que además se **caracteriza por que** dicha fotolesión cutánea comprende uno de los siguientes síntomas: adelgazamiento de la piel, atrofia de la piel, reducción de las fibras de colágeno y de las fibras elásticas, elastosis, pérdida de elasticidad de la piel, sequedad, formación de arrugas, infiltración de células inflamatorias, envejecimiento prematuro de la piel, cambio vascular, cambio pigmentario, comedón, quistes y cambio patológico de la piel.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en la prevención y/o tratamiento de la inflamación en un sujeto humano o animal.
9. Uso cosmético de una composición **caracterizada por** un extracto hidrosoluble de una planta del género *Solanum*, comprendiendo dicho extracto hidrosoluble solamargina y solasonina y pudiéndose obtener dicho extracto hidrosoluble mediante las siguientes etapas:
 - (a) someter un material vegetal de una planta del género *Solanum* a un tratamiento de extracción usando una solución acuosa ácida con un valor de pH de 3~5, de modo que se obtiene una solución acuosa;
 - (b) ajustar el valor del pH de la solución acuosa obtenida en la etapa (a) hasta un pH 8~10 con una base, de modo que se forma un precipitado;
 - (c) lavar el precipitado formado en la etapa (b) con agua, seguido de secado, de modo que se obtiene un producto seco;
 - (d) mezclar el producto seco obtenida en la etapa (c) con cloroformo, seguido de la adición de una cantidad adecuada de un alcohol al 100 %, de modo que se forma una mezcla de cloroformo-alcohol;
 - (e) mezclar el cloroformo-alcohol formado en la etapa (d) con una solución de agua/alcohol que tiene una relación agua/alcohol predeterminada, de modo que se obtiene una mezcla que contiene una capa a base de cloroformo y una capa no a base de cloroformo;
 - (f) eliminar la capa a base de cloroformo de la mezcla obtenida en la etapa (e), seguido de la adición de una cantidad adecuada de agua; y
 - (g) obtener un sobrenadante de la mezcla resultante de la etapa (f), seguido de secado del sobrenadante, en el

que el producto seco resultante es capaz de disolverse directamente en agua para formar una solución clara y transparente amarillenta.

- 5 10. El uso cosmético de la reivindicación 9, que además se **caracteriza por que** dicho extracto hidrosoluble comprende al menos 60 % en peso de solamargina y solasonina.
11. El uso cosmético de la reivindicación 9, que además se **caracteriza por que** dicho extracto hidrosoluble comprende de 60-90 % en peso de solamargina y solasonina.
- 10 12. El uso cosmético de la reivindicación 9, 10 u 11, en el que dicha composición además se **caracteriza por un** adyuvante cosméticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en disolvente, agentes gelificantes, agentes de activación, conservantes, antioxidantes, agentes filtrantes, agentes quelantes, tensioactivos, agentes colorantes, agentes espesantes, cargas, fragancia y absorbente del olor.

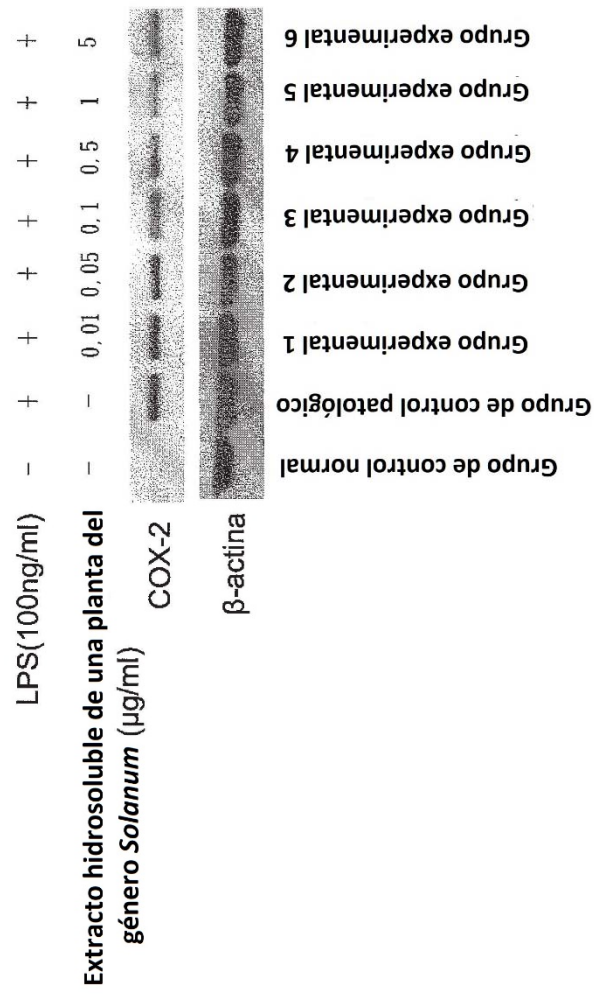


FIG. 1

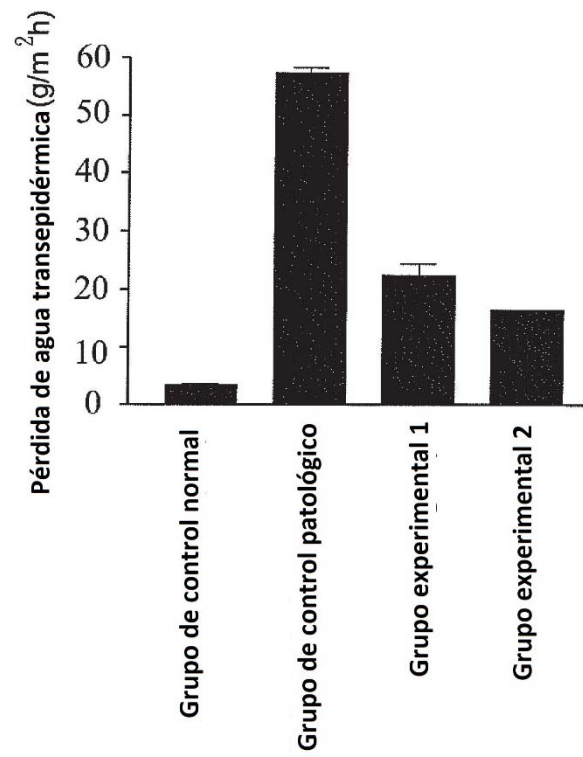


FIG. 2

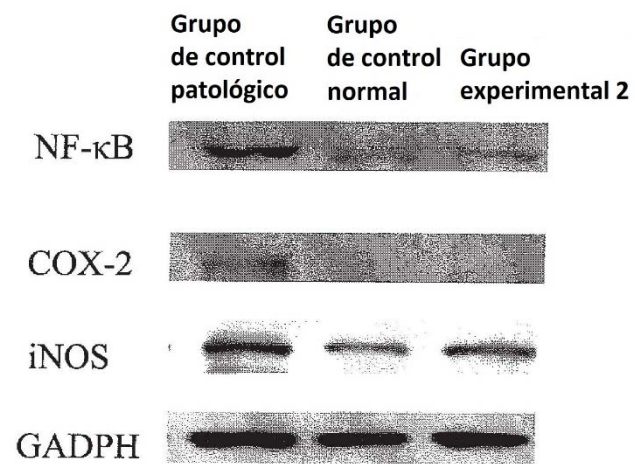
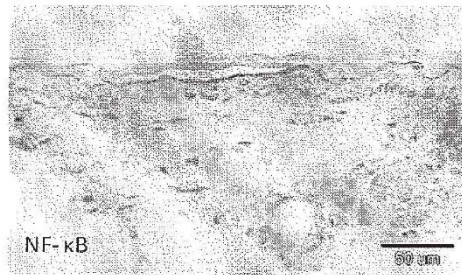
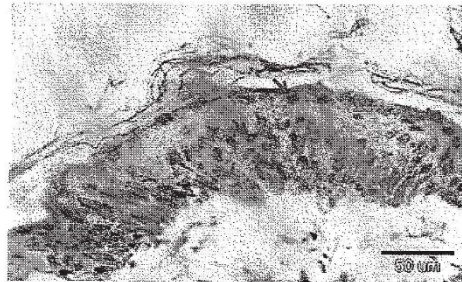


FIG. 3

**Grupo de control
normal**



**Grupo de control
patológico**



**Grupo
experimental 2**

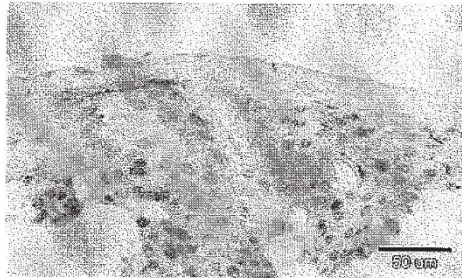
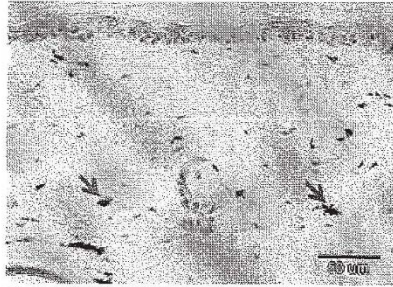
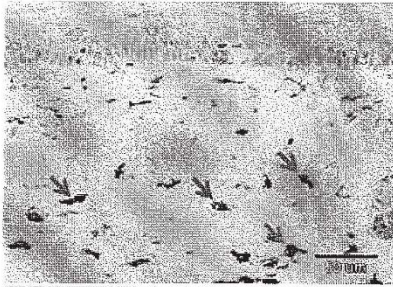


FIG. 4

**Grupo de control
normal**



**Grupo de control
patológico**



**Grupo
experimental 2**

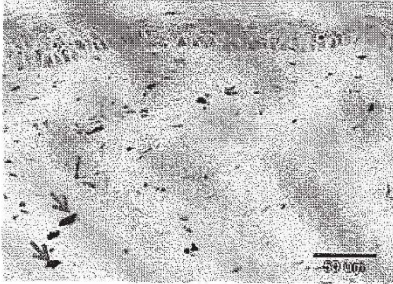


FIG. 5

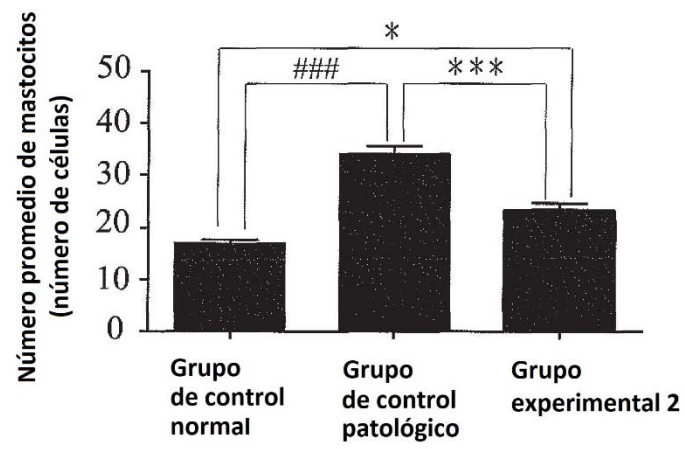


FIG. 6

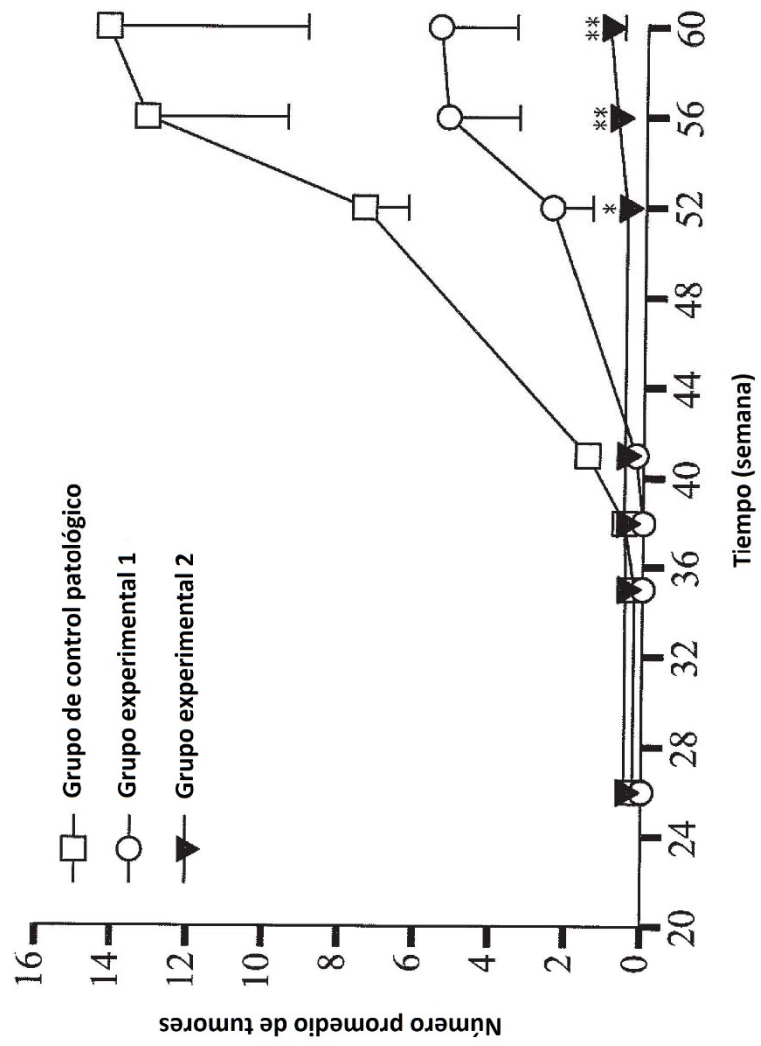


FIG. 7

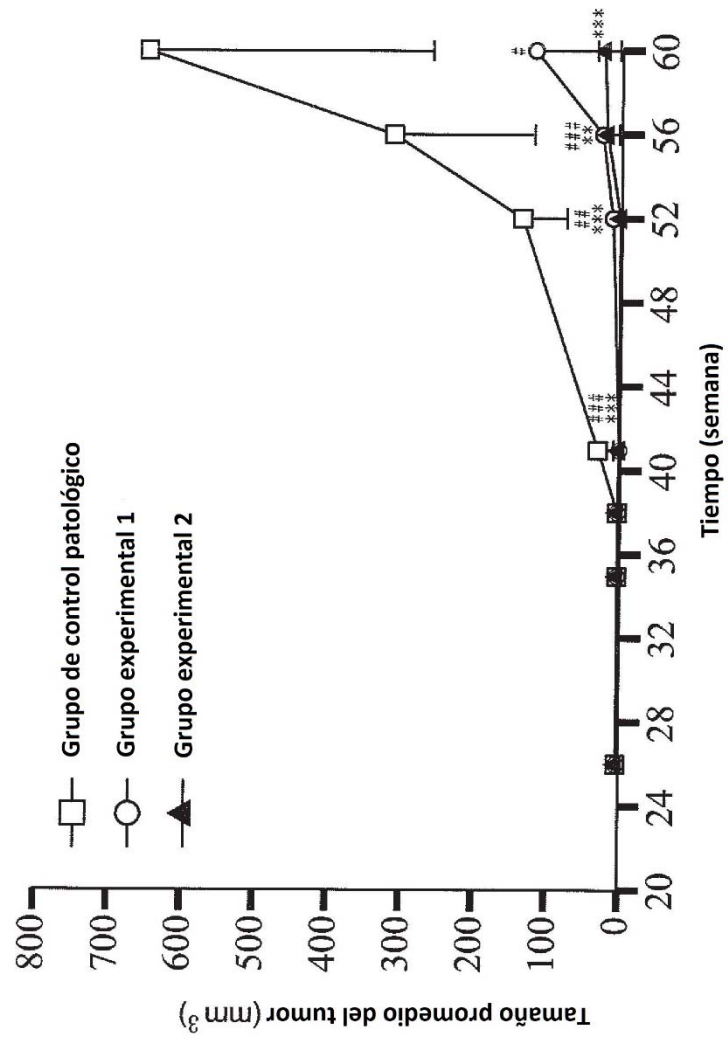


FIG. 8

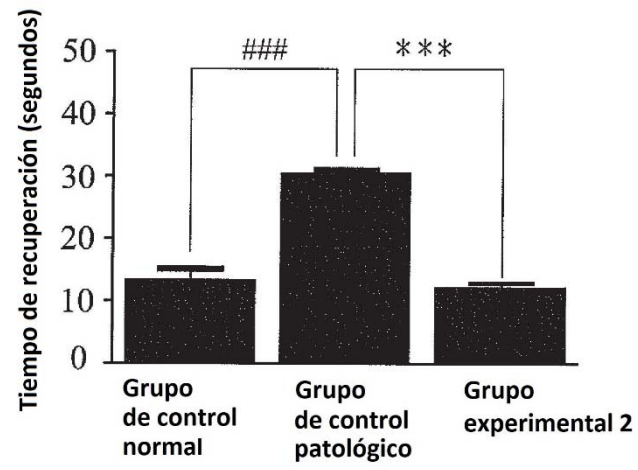


FIG. 9

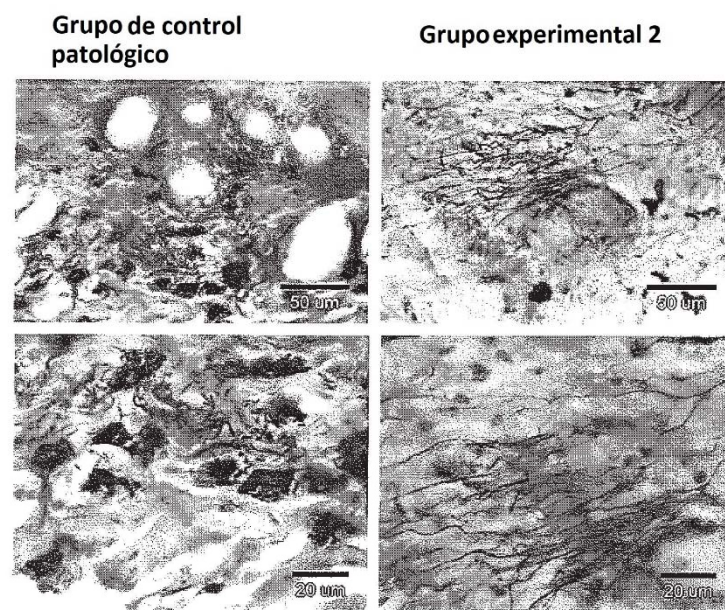


FIG. 10

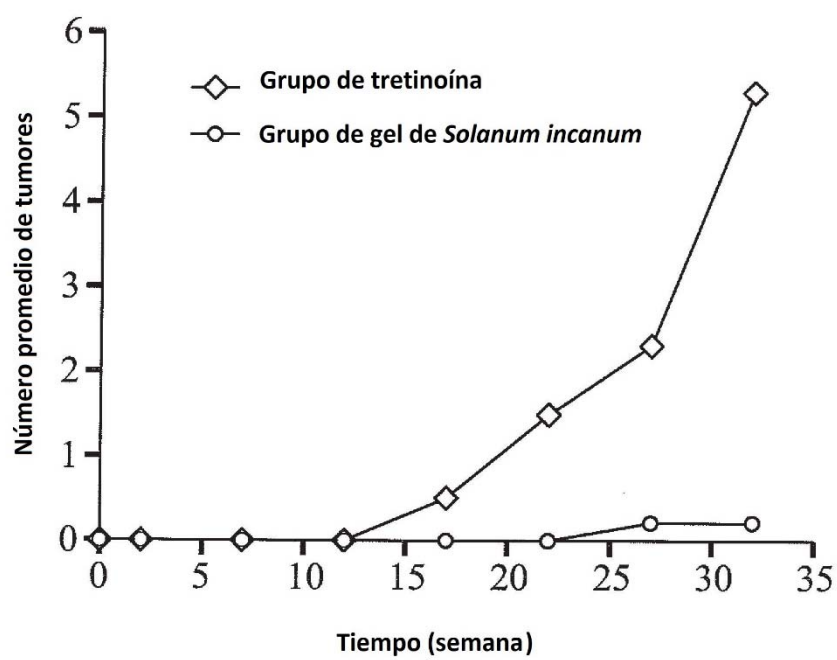


FIG. 11

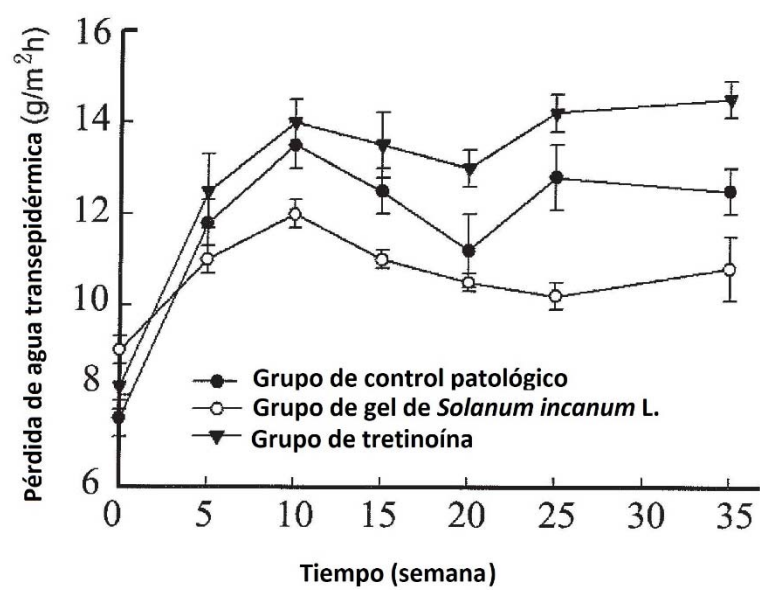


FIG. 12

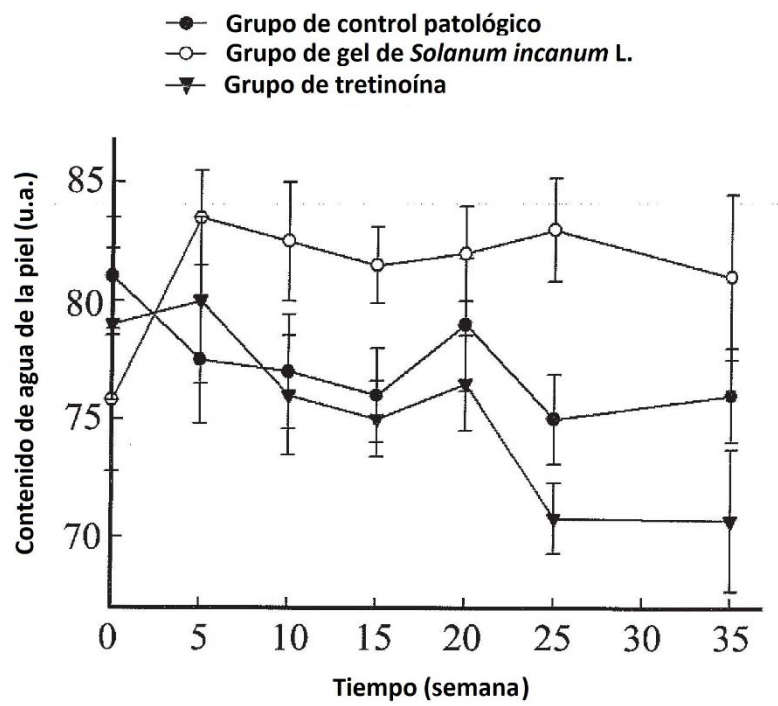


FIG. 13