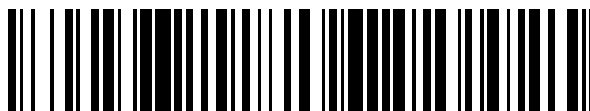


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 565**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/715** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

**A61P 11/06** (2006.01)

**A61K 36/8984** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2009** **E 09800838 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013** **EP 2318018**

54 Título: **Extracto de polisacáridos de Dendrobium para el tratamiento de enfermedades alérgicas**

30 Prioridad:

**22.07.2008 US 177728**

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

**28.05.2013**

73 Titular/es:

**WU, SOPHIA SHU FEN (50.0%)**

**426 Park Avenue**

**Yonkers, NY 10703, US y**

**WU, RONG-TSUN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WU, RONG-TSUN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 404 565 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

Extracto de polisacáridos de *Dendrobium* para el tratamiento de enfermedades alérgicas

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades alérgicas con polisacáridos aislados de *Dendrobium*.

Antecedentes

10 *Dendrobium* es un género de orquídeas tropicales ampliamente distribuida en Asia, Europa y Australia. Algunas de sus especies tienen una larga historia de uso en la medicina tradicional china para mejorar la calidad de la piel y de la visión. También se ha informado de que *Dendrobium* exhibe actividad antioxidante, antiinflamatoria, y de inmunorregulación. Véase Satoh et al., Biochem. Pharmacol. 51: 339 - 343, 1996; Yamaguchi et al., Cordyceps sinensis.. Phytoher. Res. 14: 647 - 649, 2000; Zhao et al., J. Biochem. Molecular Bio. 40 (5): 670 - 677 2007, y US 20060251739.

Resumen de la invención

15 La presente invención se basa en los descubrimientos inesperados de que los polisacáridos preparados a partir de *Dendrobii Herba* (es decir, tallo de *Dendrobium*) son efectivos en el tratamiento de enfermedades alérgicas tales como el asma, alergia al polen, y dermatitis atópica.

En consecuencia, la presente invención proporciona polisacáridos preparados a partir de *Dendrobii Herba* para uso en el tratamiento de enfermedades alérgicas (por ejemplo, asma, alergia al polen, conjuntivitis alérgica, o dermatitis atópica) mediante la administración (por ejemplo, por vía oral) a un individuo de una cantidad efectiva del mismo.

20 El término "tratamiento" como se usa aquí se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o más agentes activos a un individuo, que tiene una enfermedad alérgica, un síntoma de la enfermedad alérgica, o una predisposición hacia la enfermedad alérgica, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, aliviar, mejorar, o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad. "Una cantidad efectiva" como se usa aquí se refiere a la cantidad de cada agente activo requerida para  
25 conferir un efecto terapéutico al individuo, ya sea sola o en combinación con uno o más agentes activos. Las cantidades eficaces varían, como lo reconocen aquellos capacitados en la técnica, dependiendo de la vía de administración, del uso de excipientes, y del uso al mismo tiempo con otros agentes activos.

30 En un ejemplo, los polisacáridos utilizados para la práctica del método de esta invención se preparan mediante un procedimiento que incluye al menos las siguientes cinco etapas: (i) remojar una primera preparación de *Dendrobii Herba* en un primer alcohol (por ejemplo, metanol, etanol, o una mezcla de los mismos), (ii) remover el primer alcohol para producir una segunda preparación de *Dendrobii Herba*; (iii) extraer la segunda preparación de *Dendrobii Herba* con agua (es decir, agua pura o en un disolvente adecuado que contiene agua) para obtener una solución acuosa; (iv) mezclar la disolución acuosa con un segundo alcohol (por ejemplo, etanol al 50% en volumen) para permitir la precipitación de los polisacáridos, y (v) recoger los polisacáridos precipitados.

35 La presente invención proporciona además los polisacáridos descritos anteriormente para uso en la reducción de la remodelación de las vías respiratorias como resultado de la inflamación mediante la administración a un individuo que requiera del mismo de una cantidad efectiva del mismo.

40 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la siguiente descripción. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos:

45 La FIG. 1 es un diagrama que muestra el efecto de *Dendrobii Herba* sobre la prueba de AHR de los ratones para el Ejemplo 2, en términos del nivel relativo de pench (*Penh*) como el registrado y analizado por el sistema Buxco XA. El grupo negativo (n = 6, □) era de ratones sanos. El grupo de control (n = 10, ■) se sensibilizó con OVA pero sin tratamiento con *Dendrobii Herba*. Los grupos de tratamiento sensibilizados con OVA fueron alimentados con una

dosis de 10 mg/kg/día (n = 8, ) , 30 mg/kg/día (n = 8, ) , y 90 mg/kg/día (n = 8, ) , El Penh se registró y analizó mediante el sistema Buxco XA. \* indica p <0,05.

La FIG. 2 es un diagrama que muestra el número total de células contadas en BALF a partir de los ratones en el Ejemplo 2. El grupo negativo (n = 6, ) era de ratones sanos. El grupo de control (n = 10, ) , se sensibilizó con OVA pero sin tratamiento con *Dendrobii Herba*. Los grupos de tratamiento sensibilizados con OVA fueron alimentados con una dosis de 10 mg/kg/día (n = 8, ) , 30 mg/kg/día (n = 8, ) , y 90 mg / kg / día (n = 8, ) , \* indica p < 0,05.

La FIG. 3 es un diagrama que muestra el porcentaje de leucocitos en BALF de los ratones en el Ejemplo 2. La parte A a C representa el resultado del porcentaje de los monocitos, linfocitos y eosinófilos, respectivamente, en BALF. El grupo negativo (n = 6, ) era de ratones sanos. El grupo de control (n = 10, ) , se sensibilizó con OVA pero sin tratamiento con *Dendrobii Herba*. Los grupos de tratamiento sensibilizados con OVA fueron alimentados con una dosis de 10 mg/kg/día (n = 8, ) , 30 mg/kg/día (n = 8, ) , y 90 mg/kg/día (n = 8, ) , \* indica p <0,05.

La FIG. 4 es un diagrama que muestra la coloración con hematoxilina y eosina (H & E) de las secciones de pulmón de los ratones en el Ejemplo 2. Se removió el tejido de pulmón de los ratones, luego se los fijó con formalina al 10%. Tres días más tarde, se embebió posteriormente el pulmón en parafina y se lo cortó en secciones de 5 µm de espesor. La parte A hasta E representaba los cinco grupos en el Ejemplo 2: el grupo normal (ratones sanos como control negativo), el grupo de control (ratones que fueron sensibilizados con OVA pero sin tratamiento con *Dendrobii Herba*), los grupos de tratamiento sensibilizados con OVA fueron alimentados con una dosis de 10 mg/kg/día (n = 8), 30 mg/kg/día (n = 8) y 90 mg/kg/día (n = 8), respectivamente. La ampliación es de 100x.

La FIG. 5 es un diagrama que muestra el porcentaje de células reguladoras T en los linfocitos de la lámina propia intestinal de los ratones en el Ejemplo 2. Las proporciones de células CD4+CD25+ fueron analizadas por citometría de flujo. El grupo negativo (n = 6, ) era de ratones sanos. El grupo de control (n = 10, ) se sensibilizó con OVA pero sin tratamiento con *Dendrobii Herba*. Los grupos de tratamiento sensibilizados con OVA fueron alimentados con una dosis de 10 mg/kg/día (n = 8, ) , 30 mg/kg/día (n = 8, ) , y 90 mg/kg/día (n = 8, ) , \* indica p < 0,05.

La FIG. 6 es un diagrama que muestra los efectos de *Dendrobii Herba* sobre los niveles de IgE específicos de OVA de los ratones en el Ejemplo 2. La parte A representa el resultado del nivel en suero, y la parte B representa el resultado del nivel en BALF. El grupo negativo (n = 6, ) fue de ratones sanos. El grupo de control (n = 10, ) se sensibilizó con OVA pero sin tratamiento con *Dendrobii Herba*. Los grupos de tratamiento sensibilizados con OVA fueron alimentados con una dosis de 10 mg/kg/día (n = 8, ) , 30 mg/kg/día (n = 8, ) y 90 mg/kg/día (n = 8, ) , \*\* indica p < 0,01.

La FIG. 7 es un diagrama que muestra los resultados de RT-PCR de tejido pulmonar completo de los ratones en el Ejemplo 2. La parte A hasta E representa los resultados del nivel de expresión génica de *IL-13*, eotaxina-1, 3-dioxigenasa (*IDO*), *IL-17*, y linfopoyetina estromal tímica (TSLP), respectivamente. Todo el nivel de expresión de ARNm se normaliza a ARNm de β-actina. El grupo negativo (n = 6, ) fue de ratones sanos. El grupo de control (n = 10, ) , se sensibilizó con OVA pero sin tratamiento con *Dendrobii Herba*. Los grupos de tratamiento sensibilizados con OVA fueron alimentados con una dosis de 10 mg/kg/día (n = 8, ) , 30 mg/kg/día (n = 8, ) y 90 mg/kg/día (n = 8, ) \* indica p < 0,05.

La FIG. 8A es una fotografía que muestra los ojos inflamados de los ratones normales sin sensibilización 24 horas después del desafío.

La FIG. 8B es una fotografía que muestra los ojos inflamados de los ratones de control, que están inmunizados en forma activa pero sin tratamiento de polisacáridos 24 horas después del desafío.

La FIG. 8C es una fotografía que muestra los ojos inflamados de los ratones inmunizados en forma activa a los que se les administró en forma oral 30 mg/kg/día de polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba*.

La FIG. 8D es una fotografía que muestra los ojos inflamados de los ratones inmunizados en forma activa a los que se les administran en forma oral 90 mg/kg/día de polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba*.

La FIG. 9 es un diagrama que muestra la producción de lágrima en cada grupo de ratones mediante la medición de la longitud de cambio de color (mm) en el guión de papel de filtro. \*\* Indica p <0,01.

La FIG. 10A es una fotografía que muestra la infiltración de eosinófilos en la conjuntiva en ratones normales.

La FIG. 10B es una fotografía que muestra la infiltración de eosinófilos en la conjuntiva en ratones de control, que están inmunizados en forma activa pero sin tratamiento de polisacáridos.

5 La FIG. 10C es una fotografía que muestra la infiltración de eosinófilos en la conjuntiva en los ratones inmunizados en forma activa a los que se les administró por vía oral 30 mg/kg/día de polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba*.

La FIG. 10D es una fotografía que muestra la infiltración de eosinófilos en la conjuntiva en los ratones inmunizados en forma activa a los que se les administró por vía oral 30 mg/kg/día de polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba*.

La FIG. 10E es un diagrama que muestra el recuento de eosinófilos infiltrados en la conjuntiva. \* Indica  $p < 0,05$  (en comparación con el grupo de control).

10 La FIG. 11 es un diagrama que muestra los niveles de IgE específicos del polen de ambrosía en el suero medido por ELISA los días 0, 24 y 40. El grupo normal ( $\square$ ) era de ratones sanos. El grupo control ( $\boxtimes$ ) fue sensibilizado con el polen de ambrosía pero sin tratamiento con *Dendrobii Herba*. Los grupos de tratamiento sensibilizados con polen de ambrosía fueron alimentados con una dosis de 30 mg/kg/día ( $\boxplus$ ) y 90 mg/kg/día ( $\boxminus$ ) \* indica  $p < 0,05$ , \*\* indica  $p < 0,01$ .

15 La FIG. 12A es un diagrama que muestra el número de células T CD4+CD25+ en esplenocitos por medio análisis de citometría de flujo. \* Indica  $p < 0,05$ .

La FIG. 12B es un diagrama que muestra el número de células T CD4+CD25+ en el suero mediante análisis de citometría de flujo. \* Indica  $p < 0,05$ .

20 La FIG. 13 es un diagrama que muestra el espesor de las orejas. El grupo normal ( $\square$ ) era de ratones sanos. El grupo de control ( $\boxtimes$ ) fue sensibilizado con ozazolona al 1% pero sin tratamiento con *Dendrobii Herba*. Los grupos de tratamiento sensibilizados con ozazolona al 1% fueron alimentados con una dosis de 10 mg/kg/día ( $\boxplus$ ), 30 mg/kg/día ( $\boxminus$ ) y 90 mg/kg/día ( $\boxminus$ ) \*\*\* indica  $p < 0,001$ .

#### Descripción detallada de la invención

25 Aquí se describe el uso de polisacáridos de *Dendrobii Herba* para el tratamiento de una enfermedad alérgica. "Polisacáridos" son polímeros compuestos cada uno de un número de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. Una molécula de polisacárido incluye más de 10 monosacáridos de cualquier tipo, por ejemplo, glucosa, fructosa, galactosa, xilosa o ribosa. Puede tener una estructura lineal o ramificada.

Los polisacáridos utilizados para la práctica del método de esta invención se pueden preparar a partir de *Dendrobii Herba* a través de cualquiera de los métodos convencionales. Un ejemplo es el siguiente. Se recogen tallos de una planta de *Dendrobium* (por ejemplo, *Dendrobium loddigesii*, *Dendrobium fimbriatum* var. *oculatum*, *Dendrobium chrysanthum*, *Dendrobium candidum* ex Lindl, o *Dendrobium nobile*), se secan, y se sumergen en un alcohol (por ejemplo, metanol, etanol, o una mezcla de los mismos) durante un periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, 1 - 12 horas). Después de remover el alcohol a través, por ejemplo, de evaporación, se sumergen los tallos resultantes de *Dendrobium* en agua pura o un disolvente adecuado que contenga agua durante un período suficiente de tiempo (por ejemplo, 12 - 16 horas). El disolvente que contiene agua puede ser una disolución acuosa de sal (por ejemplo, NaCl o KCl), o una mezcla que contiene  $> 70\%$  (por ejemplo, 80%, 90%, o 95%) en volumen de agua y  $< 30\%$  en volumen de un disolvente miscible en agua (por ejemplo, metanol o etanol). Se remueven las sustancias insolubles por centrifugación o filtración, resultando en una fracción soluble. Esta fracción se mezcla a continuación con un alcohol (por ejemplo, etanol al 30 - 70%) para precipitar los polisacáridos. Opcionalmente, antes de mezclarse con el alcohol, la fracción soluble en agua se diluye en agua caliente y se mantiene a 50 - 70° C durante 20 - 60 minutos. Se recogen los precipitados, por ejemplo, por centrifugación, y preferiblemente se secan, para obtener los polisacáridos que son usados en el método de esta invención.

Los polisacáridos de *Dendrobii Herba* descritos anteriormente se puede mezclar con un portador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, con otro agente terapéuticamente activo, para formar una composición farmacéutica. El portador en la composición farmacéutica debe ser "aceptable" en el sentido de que es compatible con el ingrediente activo de la composición (y preferiblemente, capaz de estabilizar el ingrediente activo) y no perjudicial para el individuo a tratar. Se pueden utilizar uno o más agentes solubilizantes como excipientes farmacéuticos para la administración de la composición farmacéutica que contiene polisacáridos. Ejemplos de otros portadores incluyen dextrina, óxido de silicio, estearato de magnesio, celulosa, lauril sulfato sódico, Yellow # 10 de D&C, celulosa microcristalina, manitol, glucosa, leche en polvo desgrasada, polivinilpirrolidona y almidón, o una combinación de los

misimos. Esta composición farmacéutica puede presentarse en una variedad de formas, tales como una tableta, cápsula, polvo, gel o líquido.

La composición farmacéutica se administra a un individuo a través de vías adecuadas de administración, por ejemplo oral, una vez o múltiples veces por día o administrada una vez cada varios días. Una formulación sólida para administración oral pueden contener portadores o excipientes adecuados, tales como almidón de maíz, gelatina, lactosa, acacia, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, carbonato de calcio, cloruro de sodio, o ácido algínico. Los disgregantes que se pueden utilizar incluyen, sin limitación, microglicolato, y ácido algínico. Los aglutinantes para tabletas que se pueden usar incluyen acacia, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona (Povidona3), hidroxipropil metilcelulosa, sacarosa, almidón y etilcelulosa. Los lubricantes que se pueden usar incluyen estearatos de magnesio, ácido esteárico, fluido de silicona, talco, ceras, aceites y sílice coloidal.

Esta formulación sólida puede ser diseñada de tal manera que la composición se libere en el intestino. Por ejemplo, la composición se introduce en una subunidad sólida o en un compartimento de una cápsula que tienen, respectivamente, una matriz o una pared o un cierre que comprende un polímero entérico que se disuelve o se dispersa al pH del intestino delgado o grueso para liberar la sustancia farmacéutica en el intestino.

En otro ejemplo, los polisacáridos descritos anteriormente, se mezclan con uno o más portadores comestibles para formar un producto alimenticio (por ejemplo, yogur, leche o leche de soja), o un suplemento alimenticio (por ejemplo, un suministro de nutrientes o un producto herbal). Los ejemplos de un portador comestible incluyen almidón, ciclodextrina, maltodextrina, metilcelulosa, carbonometoxi celulosa, goma xantana, y soluciones acuosas de los mismos. Tales productos alimenticios pueden ser preparados por métodos bien conocidos en la industria alimenticia. Tal como se utiliza aquí, el término "alimento" se refiere en general a cualquier tipo de materiales líquidos y sólidos/semisólidos que se utilizan para la nutrición de seres humanos y animales, para sostener un crecimiento normal o acelerado, o para mantener la resistencia o el estado de alerta.

Los polisacáridos descritos aquí se pueden utilizar para tratar enfermedades alérgicas, por ejemplo, enfermedades alérgicas asociadas con un mayor nivel de eosinófilos, IgE, una quimioquina, o una citoquina Th2. Es bien sabido que un alérgeno desencadena una cascada de respuestas inmunes, incluyendo diferenciación de células T hasta células efectoras Th2; la liberación de citoquinas Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13), la producción de IgE; y la activación de neutrófilos tales como eosinófilos o mastocitos. Las respuestas inmunes desencadenadas por un alérgeno resultan en diferentes enfermedades alérgicas, tales como asma, alergia al polen, conjuntivitis alérgica y dermatitis atópica.

El asma es una enfermedad crónica que involucra al sistema respiratorio. Las características fundamentales en los humanos son la inflamación de las vías respiratorias, hipersecreción de moco altamente viscoso, y broncoconstricción. Este estrechamiento las vías respiratorias provoca síntomas tales como respiración sibilante, falta de aire, opresión en el pecho y tos. Estas características pueden ser desencadenadas por situaciones tales como la exposición a un estimulante ambiental (o alérgeno), aire frío, aire caliente, aire húmedo, o estrés emocional. Además, la sensibilización alérgica se define también por la producción de IgE contra antígenos ambientales, el reclutamiento de linfocitos y de eosinófilos en los pulmones y en el suero, y la inducción de la producción de citoquinas Th2 o quimioquinas. La atención pública en el mundo desarrollado se ha enfocado recientemente en el asma debido a su prevalencia que aumenta rápidamente, afectando a uno de cada cuatro niños de la ciudad. Véase Craig M. Lilly, Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 115, Edición 4, suplemento 1 de abril de 2005, páginas S526 - S531.

Al igual que el asma, la dermatitis atópica y conjuntivitis alérgica resultan ambas de la hipersensibilidad a alérgenos, tales como el polen; sin embargo, la región inflamada y los síntomas varían. Del mismo modo, estas enfermedades alérgicas están también relacionada con un exceso de citoquinas Th2 o quimioquinas, y la proporción con respecto al número del nivel de IgE y de eosinófilos en la región inflamada.

La conjuntiva es una membrana delgada que cubre el ojo. Cuando un alérgeno irrita la conjuntiva, los síntomas comunes que se presentan en el ojo incluyen: rasquiña ocular, hinchazón de los párpados, lagrimeo, fotofobia, secreción acuosa, y la sensación de cuerpo extraño. El alérgeno desencadenará un proceso alérgico típico como los anteriormente mencionados. El estudio mostró que los pacientes limitaron ciertas actividades tales como salir al aire libre, leer, dormir, y conducir. Por lo tanto, el tratamiento de los pacientes con conjuntivitis alérgica puede mejorar su calidad de vida cotidiana.

La atopia, o el síndrome atópico, es una hipersensibilidad alérgica que afecta partes del cuerpo que no están en contacto directo con el alérgeno. Puede tratarse de eczema (dermatitis atópica), conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica y asma. Parece que existe un fuerte componente hereditario. Un síndrome atópico puede ser fatal para aquellos que experimentan serias reacciones alérgicas tales como anafilaxia, provocada por reacciones a alimentos o al medio ambiente. Aunque la atopia tiene varias definiciones, más consistentemente se define por la presencia de niveles

elevados de IgE total y específico de alérgeno en el suero del paciente, lo que conduce a pruebas de punción cutánea positivas a los alérgenos comunes. Desde el siglo XX, muchos trastornos inflamatorios de las mucosas se han vuelto dramáticamente más comunes; la atopía es un ejemplo clásico de este tipo de enfermedad. En la actualidad afecta a un 10 - 20% de los niños y el 1 - 3% de los adultos en países industrializados, y su prevalencia se ha más que duplicado en los últimos treinta años.

Los polisacáridos de *Dendrobii Herba* descritos aquí también se pueden ser usador para aumentar la población de células T reguladoras en el sitio de la lámina propia intestinal, por ejemplo, a través de administración oral. El término "célula T reguladora" usado aquí se refiere a una subpoblación especializada de células T que actúan para suprimir la activación del sistema inmune y por lo tanto mantener la homeostasis del sistema inmune y la tolerancia a antígenos propios. Algunas veces también se llaman células T supresoras. Las células T reguladoras se presentan de muchas maneras, incluyendo aquellas que expresan la glicoproteína transmembrana CD8 (células T CD8+), aquellas que expresan CD4, CD25 y Foxp3 (células T reguladoras CD4+CD25+ o "Tregs") y otros tipos de células T que tienen función supresora. En una realización, las células T reguladoras se refieren a la población que expresa CD4 y CD25.

El término "lámina propia intestinal" usado aquí se refiere a una capa delgada de tejido conectivo laxo que se encuentra debajo del epitelio y junto con el epitelio constituye la mucosa. En esta región, existen muchas células inmunes retenidas aquí, por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, células T, células B o mastocitos, etc.

En otro ejemplo, también se pueden administrar los polisacáridos a un individuo para reducir los niveles de IgE de ese individuo en el suero y en BALF. IgE juega un papel clave en la patogénesis de la alergia. Al igual que otras inmunoglobulinas, IgE es producida por los linfocitos B después de la exposición a un antígeno extraño del ambiente. Cuando dos o más moléculas de IgE se unen a la superficie de una célula simultáneamente se enlazan a su alérgeno específico, la célula liberará inmediatamente citoquinas inflamatorias preformadas, incluyendo histamina, que inducen los efectos inmediatos o la fase temprana de la alergia. Estas citoquinas reclutan eosinófilos, macrófagos y más basófilos hacia el área. Estas sustancias recientemente sintetizadas y las células que ellas reclutan son los actores principales en la fase tardía de la respuesta alérgica. La estrecha asociación entre la IgE, alergia y asma ha sido reconocida desde hace mucho tiempo (Platts-Mills TAE, Am J Respir Crit Care Med, 164: S1 - S5, 2001; Milgrom H, et al., N Eng J Med, 341: 1966 - 73, 1999). En una realización, los ratones alimentados con los polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* tenían menores niveles de IgE en suero y en BALF. También, estos ratones tenían menos eosinófilos y citoquinas o quimioquinas que atrajeron las células inmunes y estimularon el epitelio de las vías respiratorias. Por lo tanto, los polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* podrían tratar el asma.

En aún otro ejemplo, se usan los polisacáridos para reducir la remodelación de las vías respiratorias resultantes de la inflamación por medio de la administración oral al individuo con polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba*.

El término "remodelación de las vías respiratorias" utilizado aquí se refiere a cambios estructurales que tienen lugar junto con, o debido a, inflamación crónica de las vías respiratorias. La remodelación de las vías respiratorias resulta en alteraciones en el epitelio de las vías respiratorias, la lámina propia y la submucosa, lo que conduce a un engrosamiento de la pared de las vías respiratorias. Las consecuencias de la remodelación de la vía respiratorias en el asma incluyen un estrechamiento de las vías respiratorias reversible en forma incompleta, hiperreactividad bronquial, edema de vías respiratorias, e hipersecreción de moco.

Sin una elaboración adicional, se cree que una persona ordinariamente capacitada en el arte puede, con base en la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Las siguientes realizaciones específicas, por lo tanto, deben interpretarse como simplemente ilustrativas, y no limitativas del resto de la divulgación en modo alguno.

### Ejemplo 1

Preparación de los polisacáridos de *Dendrobii Herba*

Se secaron 2 kg de *Dendrobii Herba* frescos para formar el material seco, y después se sumergió el material seco y se lo trató con 20 L de metanol para obtener una planta tratada. La planta tratada fue tratada con un proceso de eliminación del metanol, y luego sumergida en agua durante la noche para obtener una solución en agua durante la noche. La solución en agua durante la noche se extrajo con 24 L de agua caliente en un rango de temperatura de 60° C durante 30 min, y luego se centrifugó en una centrífuga (ER-RC13 C-124, HITACH) a 5.000 rpm y 10° C. Después de la centrifugación, se filtró el sobrenadante a través de un papel filtro de 6 µm. El filtrado se precipitó con etanol al 50% (p / v) para obtener los polisacáridos.

### Ejemplo 2

El efecto de los polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* sobre el Asma

Configuración de un modelo animal de asma

Se agruparon ratones BALB/c machos aleatoriamente en grupo normal (n = 6, ratones sanos como control negativo), el grupo de control (n = 10, ratones sensibilizados con OVA, pero sin el tratamiento de los polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba*), los grupos de tratamiento sensibilizados con OVA fueron alimentados con una dosis de 10 mg/kg/día (n = 8), 30 mg/kg/día (n = 8) y 90 mg/kg/día (n = 8). Excepto el grupo normal, todos los ratones fueron inmunizados con una inyección intraperitoneal de 20 y 50 µg/ml de OVA (Sigma, EE.UU.) en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), combinada con los 2 mg y 5 mg de Al(OH)<sub>3</sub> como adyuvante en el día 1 y 14, respectivamente. A los ratones de control negativo se les suministró una inyección intraperitoneal de 1 x PBS en cada inmunización. Todos los ratones fueron expuestos a OVA al 1% en PBS durante 20 min por medio de un nebulizador ultrasónico (Buxco) en el Día 28, 29, 30. En el Día 31, todos los ratones fueron sometidos a una prueba de AHR (hiperreactividad de las vías respiratorias) por medio de diversas concentraciones de metacolina, y sacrificados el día siguiente (el método fue referido por Charles Perkins et al., J. Allergy Clin. Immunol., 118 (2): 410 - 419). En el Día 0, 21 y después de la prueba de AHR, se recogieron muestras de sangre de los ratones a partir del plexo venoso retroorbital. Se analizaron las muestras de sangre por los anticuerpos específicos de OVA.

Determinación de hiperreactividad de las vías respiratorias a la metacolina

Los ratones fueron colocados, sin restricciones, en cámaras cilíndricas de plexiglás de un pletismógrafo que estaban conectadas a un sistema Buxco de suministro de aerosol de control nebulizado y un aparato Buxco Max II para el análisis de pletismografía barométrica (Buxco Electronics, Sharon, CT). Las mediciones de línea base de aumento de pausa (Penh) se realizaron durante un período de 5 minutos. Penh, que se refiere a una medición sin unidades de la obstrucción de las vías respiratorias, refleja los cambios en la función pulmonar en relación con diferencias cuantitativas en tiempo y extensión entre la inspiración y la expiración. Específicamente, Penh se considera un parámetro que refleja los cambios en la forma de onda de la señal medida de la presión de la caja que son consecuencia de broncoconstricción y es un índice de obstrucción de las vías respiratorias. La gravedad del asma puede ser evaluada por el nivel de Penh (Zhang et al., J. Allergy Clin. Immunol, febrero; 113 (2): 320 - 6, 2007).

Los ratones fueron expuestos a continuación durante 3 minutos por medio de la inhalación de β-metacolina en aerosol en PBS producido con un nebulizador (Buxco Electronics, Sharon, CT), a partir de una concentración de metacolina de 6,25 mg/ml. Las mediciones de Penh se iniciaron 3 minutos después de la finalización de la exposición a la metacolina en aerosol, y se calcularon los valores promedio de Penh para el período de 3 minutos. Posteriormente, se repitió el procedimiento en serie y se cambió la concentración de metacolina a 12,5 mg/mL y 25 mg/mL. Todos los datos registrados se normalizaron a las mediciones de línea base, y los resultados de cada grupo se muestra en la FIG. 1.

AHR contribuye de manera significativa a la obstrucción de las vías respiratorias y los síntomas cardinales en el asma, tales como dificultad para respirar, opresión en el pecho, tos y dificultad para hablar. Por consiguiente, la inhibición de la AHR puede aliviar la gravedad del asma. Como se muestra en la FIG. 1, todos los tres grupos de tratamiento mostraron una disminución significativa de las respuestas de Penh para 25 mg/mL de metacolina en aerosol en comparación con el grupo control. Se indicó que los polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* podrían inhibir la AHR, por lo que podría tratar el asma.

Análisis del fluido de lavado broncoalveolar (BALF)

El "fluido de lavado broncoalveolar" es el fluido obtenido por lavado del compartimiento alveolar del pulmón. Se utiliza para determinar los cambios bioquímicos e inflamatorios en el tejido pulmonar intersticial, con lo que se evalúa la eficacia del método de la presente invención.

Después de la dislocación cervical, se expuso la tráquea y se la incubó con un catéter de polietileno. Se recogió el BALF de los ratones mediante lavado con 1 ml de PBS a través de la tráquea. Después de centrifugar el lavado, se utilizó el sobrenadante para la detección de anticuerpos y se obtuvo un recuento total de células del precipitado. Se prepararon portaobjetos de citospina y se la tiñó por medio de la coloración de Liu, una modificación de la tinción de Giemsa (Sevens, M. L., Fundamentals of clinical hematology, W. B. Saunders Company, 1997).

Las células de BALF de los ratones se tiñeron primero mediante la adición de 0,5 ml de solución A de Liu (preparada mediante la disolución de 0,18 g de eosina Y y 0,05 g azul de metileno en 100 mL de metanol, seguido por filtración de la solución resultante a través de un papel de filtro No. 3) durante 30 segundos. Después de eso, se añadió inmediatamente 1 mL de solución B de Liu (preparada disolviendo 0,12 g de azul de metileno, 0,14 g de azul celeste B, 2,52 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1,26 g de KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 100 mL de H<sub>2</sub>O, seguido por filtración de la solución resultante a través de un papel de filtro No. 3) a la mezcla con la coloración A de Liu. Después de un tiempo de reacción de 60 segundos, se lavó el portaobjetos con agua para limpiar la solución de tinción. El portaobjetos se secó al aire y luego

se examinó bajo un microscopio óptico de fases, y se obtuvieron las diferencias después del recuento de 300 células. Los resultados se muestran en la FIG. 2 y en la FIG 3.

Como se muestra en la FIG. 2, el número total de células en un grupo de 90 mg/kg/día en comparación con el grupo de control había disminuido significativamente. Además, los porcentajes de cada tipo de células (eosinófilos, neutrófilos, monocitos y linfocitos) se muestran en la FIG. 3. Los porcentajes de eosinófilos y de linfocitos se redujeron significativamente en el grupo tratado por vía oral con 90 mg/kg/día de polisacáridos de *Dendrobii Herba* en comparación con el grupo control.

Sin estar limitado por la teoría, los polisacáridos obtenidos de *Dendrobii Herba* pueden ser efectivos en el tratamiento del asma mediante el siguiente mecanismo. Se ha reportado que los eosinófilos juegan un papel clave en el desarrollo del asma. Véase Walsh G. M., Curr Opin Hematol, 8 (1): 28 - 33, 2001; y Menzies-Gow A et al., J Asthma, 38 (8): 605 - 13, 2001. Como se mostró anteriormente, los polisacáridos de *Dendrobium* redujeron el número de eosinófilos en el BALF, aliviando de ese modo los síntomas asmáticos.

Efecto de los polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* sobre los eosinófilos y la remodelación de las vías respiratorias en los pulmones

Después de obtener el BALF, se fijó el tejido pulmonar en formalina al 10% amortiguada neutra durante 24 h. Se embebió el tejido pulmonar en parafina, y luego se cortó en secciones de 5 µm de espesor. Las secciones se tiñeron con solución de H & E (hematoxilina; Sigma MHS-16 y eosina, Sigma HT110-1-32). Se fotografiaron y mostraron los resultados en la FIG. 4.

El asma se caracteriza por un patrón específico de la inflamación en la mucosa respiratoria, y consiste en la infiltración de eosinófilos, el aumento del número de células T<sub>H2</sub> en relación con las células T<sub>H1</sub>. Además, hay cambios característicos de la estructura de las vías respiratorias, llamados remodelación, algunos de los cuales incluso pueden preceder al desarrollo de la enfermedad. Estos cambios estructurales observados en pacientes asmáticos pueden incluir engrosamiento de la membrana basal reticular de la pared de las vías respiratorias, la formación de una red de fibras elásticas anormales, alteraciones en la estructura cartilaginosa de las vías respiratorias, angiogénesis, y aumento de la masa del músculo liso de las vías respiratorias.

En la presente invención, el grupo de control obviamente muestra el engrosamiento basal del epitelio de las vías respiratorias y el estrechamiento de los tubos bronquiales. Como la dosis de tratamiento de polisacáridos de *Dendrobii Herba* subió, se redujeron las características de remodelación de las vías respiratorias y el diámetro de los tubos bronquiales volvió a la normalidad. En la combinación con los resultados de la FIG. 2, la presente invención incluye un método para disminuir el número de eosinófilos y de linfocitos, también el alivio de los síntomas de la remodelación de las vías respiratorias.

El tratamiento oral de los polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* puede aumentar el porcentaje de Treg en la lámina propia intestinal

Los ratones fueron sacrificados por medio de dislocación cervical. El intestino delgado se removió inmediatamente y se lo enjuagó en HBSS (con HEPES, libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>). Se diseccionaron cuidadosamente parches de Peyer y cortaron en segmentos. Para remover las células del epitelio, se agitaron los segmentos con solución de ditiotritol 1 mM (DTT, Amresco, EE.UU.) y ácido etilendiaminotetraacético 1 mM (EDTA, Sigma, EE.UU.) a 37° C durante una hora. Después de la incubación, se picaron los segmentos en pedazos de 1 mm y se digirió en RPM1 1640 (Gaithersburg, EE.UU.) que contenía 30 unidades / mL de colagenasa tipo I (Sigma, EE.UU.) y 10 unidades / mL de colagenasa tipo II (Sigma, EE.UU.) así como suero de ternera fetal al 10% a 37° C durante una hora. El tejido digerido fue pasado a través de una malla de nylon (Small Parts, EE.UU.) para obtener las células. Después de un lavado profundo, se obtuvieron las células mononucleares mediante centrifugación en Percoll.

Se ajustaron las células mononucleares a razón de 1 x 10<sup>6</sup> células / ml, y se añadieron al tubo para incubaron con anticuerpo CD4 conjugado con FITC (BD Biosciences, EE.UU.) y el anticuerpo CD25 conjugado con PE (BD Biosciences, EE.UU.) durante 30 min a 4° C en la oscuridad. Se lavaron las muestras dos veces en PBS frío y se analizaron por citometría de dos colores llevada a cabo con un FACScan (Becton Dickinson Bioscience, EE.UU.). El número de células CD4+CD25+ dividido por el número de células CD4+ era el porcentaje de Treg. Los resultados se muestran en la FIG. 5. Los ratones alimentados con 90 mg/kg/día de polisacáridos de *Dendrobii Herba* tenían más Treg en la lámina propia intestinal.

Efectos de los polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* sobre los niveles en suero y BALF de IgE específico de OVA en los ratones sensibilizados con OVA

El suero recogido en el día 1, 14 y el día antes del sacrificio y BALF se utilizaron para detectar IgE específica de OVA por ELISA. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero por duplicado se diluyeron en proporción 1:50 y BALF no se diluyó. El anticuerpo utilizado aquí fue IgE antirratón de cabra conjugado con AP comprado a Southern BioTech (EE.UU.). Como se muestra en la FIG. 6, IgE en suero disminuye significativamente en el grupo de polisacáridos de *Dendrobii Herba* de 90 mg/kg/día. Sin embargo, el nivel de IgE de BALF también tenía tendencia a disminuir en el mismo grupo.

Hoy en día, muchas investigaciones han indicado que IgE son las moléculas clave en reacciones alérgicas inmediatas, ya que pueden formar un puente entre los alérgenos y los neutrófilos y se desencadena una desgranulación celular, con la liberación innumerables mediadores preformados y citoquinas (Holgate et al., J Allergy Clin. Immunol, 115: 459 - 465, 2005; Cooper P. J., Parasite Immunol. 26: 455 - 467, 2004; Milgrom H, et al., ut supra). Por lo tanto, la neutralización o la inhibición de la síntesis de IgE podría ser una opción racional para el tratamiento de enfermedades alérgicas (Sarinho E y Cruz A. A., J Pediatr (Rio J), 82 (5 Suppl): S127 - 32, 2006; Wagelie-Steffen AL et al., Clin Chest Med., 27: 133 - 147, 2006; Clark J et al., J Asthma, 43: 87 - 93, 2006). En la presente invención, 90 mg/kg/día de polisacáridos de *Dendrobii Herba* podrían disminuir el nivel de IgE en suero y en los pulmones de ratones con asma. En vista de estos datos, los polisacáridos de *Dendrobii Herba* tienen un gran potencial para el tratamiento de enfermedades alérgicas o asma.

Efectos de los polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* sobre la expresión génica en tejido pulmonar de los ratones sensibilizados con OVA

Se extirpó el tejido y cortó en trozos. Se aisló luego el ARN total con reactivo para aislamiento de ARN total de ARN raro (Gsharp Corporation, Taiwán) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa usó 5 µg de ARN para la síntesis de ADNc con transcriptasa inversa MMLV (Promega, EE.UU.) en un volumen total de 40 µl. La porción resultante del producto de transcripción inversa (1 µl) se utilizó para la amplificación por PCR. La Tabla 1 enlista las secuencias de los cebadores utilizados para IL-13, eotaxina-1, IDO, IL-17, y TSLP.

Tabla 1

| Gen             |                | Secuencia                         | SEQ ID NO. |
|-----------------|----------------|-----------------------------------|------------|
| <i>β-actina</i> | Hacia adelante | 5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3'        | 1          |
|                 | Hacia atrás    | 5'-TGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'        | 2          |
| 11-13           | Hacia adelante | 5'-GGAGCTGAGCAACATGACACA-3'       | 3          |
|                 | Hacia atrás    | 5'-GGTCCTGTAGATGGCATTGCA-3'       | 4          |
| eotaxina-1      | Hacia adelante | 5'-GGGCAGTAACTTCCATCTGTCTCC-3'    | 5          |
|                 | Hacia atrás    | 5'-CACTTCTTCTTGGGGTCAGC-3'        | 6          |
| IDO             | Hacia adelante | 5'-TTATGCAGACTGTGTCCTGGCAACTG-3'  | 7          |
|                 | Hacia atrás    | 5'-TTTCCAGCCAGACAGATATATGCGGAG-3' | 8          |
| IL-17           | Hacia adelante | 5'-GCTCCAGAAGGCCCTCAGA-3'         | 9          |
|                 | Hacia atrás    | 5'-AGCTTTCCCTCCGCATTGA-3          | 10         |
| TSLP            | Hacia adelante | 5'-TGCAAGTACTAGTACGGATGGGGC-3'    | 11         |
|                 | Hacia atrás    | 5'-GGACTTCTTGTGCCATTCCTGAG-3'     | 12         |

Las condiciones de la PCR para amplificar estos genes fueron 95° C durante 5 min para la degeneración inicial y seguida por 94° C durante 30 s, 58° C durante 30 s y 72° C durante 1 min. Todo el nivel de expresión del gen se normalizó con ARNm de *β-actina*. Como se muestra en la FIG. 7, el nivel de expresión de ARNm de citoquina o de quimioquina en los pulmones fue inferior en el grupo alimentado con 30 mg/kg/día y 90 mg/kg/día de polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba*.

El reclutamiento selectivo de eosinófilos por algunas quimioquinas, tales como *IL-13*, *eotaxina-1*, *IL-17* y *TSLP*, en las vías respiratorias durante la inflamación alérgica sugiere que se producen quimioatrayentes específicos de eosinófilos y liberados durante el transcurso de la inflamación pulmonar (Rothenberg M. E., N. Engl. J. Med., 338: 1592 - 1600, 1998; Lacy P et al., Chem. Immunol., 76: 134 - 155, 1998). Además, se reconoce que un aumento de IDO, que fue inducida por los eosinófilos, dará lugar a la apoptosis de Th1 y a la promoción de la polarización de Th2. En el resultado, el eosinófilo puede mantener el desbalance de Th1-Th2 observado en el asma alérgico a través de la expresión funcionalmente activa de IDO en tejido linfóide (Odemuyiwa SO et al., J Immunol. Noviembre 15, 2004; 173 (10): 5909 - 13). Por lo tanto, la inhibición de estas proteínas de la producción es útil para bloquear el progreso del asma. En la presente invención, los ratones con tratamiento oral de los polisacáridos de *Dendrobii Herba* tenían un menor nivel de expresión génica mencionado anteriormente, que los que estaban relacionados con el reclutamiento de eosinófilos o linfocitos. Debido a que estas dos células jugaban un papel principal en el proceso de la enfermedad alérgica, especialmente asma, la reducción de la quimioquina podría prevenir la infiltración en los pulmones. Consecuentemente, se pueden tratar los síntomas de la enfermedad alérgica asociada con eosinófilos, tales como asma.

### Ejemplo 3

El efecto de los polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* sobre alergia al polen

Extracción de proteína activa en el polen de ambrosía

El polen de la ambrosía fue adquirido a Polyscience, Inc. (Polyscience, Inc., Warrington, PA, EE.UU.). El polen de ambrosía (1 g) se trató con 500 µl de éter y 20 ml de bicarbonato de amonio 0,125 M durante 48 horas a temperatura ambiente para obtener un primer sobrenadante por centrifugación a 10000 x g durante 30 min. El polen tratado se trató con 12 ml de bicarbonato de amonio 0,125 M durante 24 horas a temperatura ambiente para obtener un segundo sobrenadante por centrifugación a 10000 x g durante 30 min. El primero y el segundo sobrenadantes se recogieron en una bolsa de diálisis con un tamaño de poro de 3500 Da y se dializó frente contra bicarbonato de amonio 5 mM durante 4 horas, luego se cambió por nuevo bicarbonato de amonio 5 mM y se dializó en forma continua durante 24 horas. La muestra final se liofilizó y almacenó a -20° C hasta su uso. La relación de extracción del polen fue del 21,1%, y los extractos contenían 11,9% de proteínas.

Inducción de conjuntivitis ocular por medio de inmunización activa y tratamiento con polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba*

El método de inducción de la conjuntivitis ocular fue modificada por medio de investigación previa (Schopf, L., et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005 46 (8): páginas 2772 - 80). Todos los ratones BALB/c hembra de 8 semanas de edad fueron sometidos a cirugía de ovariectomía 11 días antes de la sensibilización. Los ratones fueron inyectados en forma intraperitoneal el Día 0, 7, 14 y 29 con 200 µg de extractos de polen (que contenían 50 µg de proteína) y 4 mg de Al(OH)<sub>3</sub>, que se disolvieron en 200 µl de PBS. Los días 8 y 15, los ratones recibieron un colirio de sensibilización de 5 µl de PBS que contenía 500 µg extractos de polen y 25 µg de Al(OH)<sub>3</sub> en el ojo izquierdo. En el día 22, 23, 24 y en el día 36, 37, 38, 39, 40, los ratones fueron desafiados con extractos de polen en PBS (1 mg en 3 µg de PBS por ojo) en el ojo izquierdo. Quince minutos después del desafío, se hizo una medición de las lágrimas de los ratones, y observó el edema palpebral y el enrojecimiento de la conjuntiva. Los ratones normales no recibieron sensibilización antes mencionado pero si el mismo desafío. Los ratones de control recibieron sensibilización y desafío, pero no tratamiento de polisacáridos. A algunos de los ratones se les administró por vía oral 30 mg/kg/día o 90 mg/kg/día de polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* el día 8 hasta que fueron sacrificados el día 52.

Observación de la apariencia y valoración de las lágrimas

La conjuntivitis alérgica es una hipersensibilidad a la alergia, por ejemplo, al polen. Los síntomas consisten en comezón de ojos, edema palpebral, producción excesiva de lágrimas y enrojecimiento de la conjuntiva o parte blanca de los ojos. Para evaluar la eficacia del tratamiento de los polisacáridos, quince minutos después de cada desafío, se fotografió el ojo izquierdo de los ratones y recibieron una prueba para medir la producción de lágrimas. Con respecto a la producción de lágrimas, se utilizó una tira de papel filtro. La tira de papel filtro utilizada aquí fue sumergida primero en 0,5 g de rojo de fenol (Sigma, EE.UU.), que se disolvieron en 17,5 ml, etanol al 70%, y se secó a temperatura ambiente durante la noche. El tamaño de la tira de papel filtro era de 1 mm de ancho y 20 mm de largo. Se la colocó en el empalme de los tercios medio y lateral del párpado inferior, después de remover suavemente el exceso de secreción del párpado inferior. El tiempo estándar usado para medir la producción de lágrimas en los ratones fue de 1 minuto. Las fotografías del ojo inflamado se muestran en las FIGs. 8A - 8D, y la longitud del cambio de color se muestra en la FIG. 9.

Como el resultado mostrado en la FIG. 8A, los ojos de los ratones normales se enrojecieron e hincharon sólo ligeramente, pero aquellos de los ratones de control se hincharon y se inflamaron seriamente (FIG. 8B). Los ratones a los cuales se les administró por vía oral 30 mg/kg/día (FIG. 8C) o 90 mg/kg/día (FIG. 8D) de polisacáridos

extraídos de *Dendrobii Herba* también tenían los ojos inflamados; sin embargo, los síntomas de enrojecimiento y de hinchazón se aliviaron.

Como el resultado se muestra en la FIG. 9, de acuerdo con los síntomas de conjuntivitis alérgica, los ratones del grupo control produjeron más lágrimas después del contacto con el polen. Los ratones que recibieron por vía oral 30 mg/kg/día o 90 mg/kg/día de polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* tenían significativamente menos lágrimas en comparación con los ratones de control.

#### Análisis histológico

Se cortó la cabeza de los ratones después del sacrificio, y luego se las fijó en amortiguador de Bouin. Después de 72 horas, se reemplazó el amortiguador de Bouin por PBS que contenía EDTA al 14% (ácido etilendiaminotetraacético) para remover el calcio al menos 72 horas. Cuando se removi6 completamente el calcio, se cortó tejido diferente al del globo ocular y la conjuntiva utilizando tijeras. El tejido cortado fue embebido luego en parafina, y recortado en secciones de 5 µm de espesor. Las porciones se tiñeron con colorante de Giemsa (solución patr6n de tinci6n de Giemsa, Sigma, EE.UU.). Se hizo un recuento de los eosin6filos infiltrados en las mucosas de la l6mina propia de las conjuntivas a lo largo de cada secci6n. Los datos se presentan como un promedio ± S.E.M. por porci6n de todos los ratones examinados.

La infiltraci6n de eosin6filos en la conjuntiva puede ser utilizada como marcador de la severidad de la conjuntivitis alérgica, ya que se ha reportado que entre mayor n6mero de eosin6filos detectados mayor la severidad de la alergia (Sumi et al., Int Arch Allergy Immunol., 143 (4): 276 - 81, 2007). Como se muestra en la FIG. 10A - D, el grupo de control tenia las c6lulas m6s infiltradas. En comparaci6n con el grupo de control, el n6mero de c6lulas infiltradas disminuye significativamente en el grupo de tratamiento con 30 mg/kg/día y 90 mg/kg/día (FIG. 10E). El resultado podría indicar que el tratamiento con polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* podría aliviar la severidad de la alergia.

#### Medici6n de IgE en suero

El día 0, 24 y 40 después del desafío, se recogió la sangre de ratones inmunizados activamente y se prepar6 el suero. Los niveles de IgE de polen de ambrosía en los sueros se midieron por medio de ELISA detallado en el ejemplo antes mencionado.

Como se muestra en la FIG. 11, en el día 40, los ratones a los que se les administr6 por vía oral 30 mg/kg/día o 90 mg/kg/día de polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* tenian un nivel significativamente menor de IgE en comparaci6n con los ratones de control.

#### Análisis por citometría de flujo

Se fijaron los esplenocitos agotados en RBC aislados recientemente con formaldehído al 2%, y se lavaron con amortiguador FACS (PBS + suero de ternera fetal al 1%). Después del lavado, se incubaron las c6lulas con anticuerpo CD4+ antirrat6n conjugado con FITC de cabra en concentraci6n 6ptima durante 30 min a 4° C, y se lav6 dos veces con el mismo amortiguador. Después del lavado, se incubaron entonces las c6lulas con anticuerpo CD25+ antirrat6n conjugado con PE de cabra en concentraci6n 6ptima durante 30 min a 4° C, y se lav6 dos veces con el mismo amortiguador. Finalmente, se resuspendieron las c6lulas con 100 µl de amortiguador FACS y se analizaron sobre un FACScan (Becton Dickinson Bioscience, San Diego, California, EE.UU.). El análisis y la adquisici6n se realizaron utilizando el software CellQuest.

Como el resultado mostrado en la FIG. 12A y en la FIG. 12B, el porcentaje de c6lulas T CD4+CD25+ fue menor en esplenocitos y en suero de ratones inmunizados activamente. Comparado con los ratones de control aquellos a los que se les administr6 por vía oral 30 mg/kg/día o 90 mg/kg/día de polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* tenian mayor porcentaje de c6lulas T CD4+CD25+.

#### Ejemplo 4

El efecto de los polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* sobre la dermatitis at6pica

#### Configuraci6n del modelo animal de dermatitis at6pica

En el día 0, se sensibilizaron ratones de nueve semanas de edad por medio de la aplicaci6n de 100 µl de oxazolona al 1% en la piel del abdomen, mientras que el grupo de PBS era el grupo normal. En el día 7 y el día 8 se aplicaron 40 µl de oxazolona al 0,5% en forma t6pica en ambas orejas. El grupo de control recibió sensibilizaci6n y desafío pero sin tratamiento con polisacáridos. A los ratones de los otros grupos se les administr6 por vía oral 10 mg/kg/día,

30 mg/kg/día o 90 mg/kg/día de polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* respectivamente cuatro días antes de la sensibilización en el día 0 hasta el sacrificio. Se midió el espesor de las orejas el día 9 y 10, es decir, veinticuatro horas después del desafío en el día 8. Los datos del día 9 se presentan como un promedio  $\pm$  S.E.M. de todos los ratones examinados.

## 5 Resultado

Como los resultados mostrados en la FIG. 13, se había incrementado el espesor de las orejas de todos los ratones inmunizados en forma activa. En comparación con el grupo control, el grupo de 10 mg/kg/día y el grupo de 30 mg/kg/día no tuvieron un efecto obvio; sin embargo, el espesor de la oreja del grupo de 90 mg/kg/día disminuyó significativamente.

- 10 Se apreciará por parte de todos aquellos capacitados en la técnica que pueden hacerse cambios a las realizaciones descritas anteriormente sin apartarse del amplio concepto inventivo de la misma. Se entiende, por lo tanto, que esta invención no está limitada a las realizaciones particulares divulgadas, sino que también cubre las modificaciones dentro del espíritu y el alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

- 15 <110> Wu, Rong-Tsun

<120> EXTRACTO DE POLISACÁRIDOS DE DENDROBIUM PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ALÉRGICAS

<130> 10004-016PCT

<160> 12

- 20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

- 25 <220>

<223> cebador

<400> 1

gtgggccgcc ctaggcacca 20

<210> 2

- 30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

- 35 <400> 2

tggccttagg gttcaggggg 20

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> cebador

<400> 3

ggagctgagc aacatgacac a 21

<210> 4

10 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

15 <400> 4

ggtcctgtag atggcattgc a 21

<210> 5

<211> 25

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

## REIVINDICACIONES

1. Polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* para uso en el tratamiento de una enfermedad alérgica.
2. El polisacárido de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en donde la enfermedad alérgica está asociada con un mayor nivel de eosinófilos, IgE, una quimioquina, y/o una citoquina Th2.
- 5 3. Los polisacáridos de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en donde la enfermedad alérgica es al menos una seleccionada del grupo que consiste de asma, alergia por polen, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, y cualquier combinación de las mismas.
4. Los polisacáridos de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en donde los polisacáridos se administran en forma oral.
- 10 5. Los polisacáridos de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en donde los polisacáridos se preparan por medio de un proceso que comprende las etapas de:
  - (a) remojar una primera preparación de *Dendrobii Herba* en un primer alcohol;
  - (b) remover el primer alcohol para producir una segunda preparación de *Dendrobii Herba*;
  - 15 (c) extraer la segunda preparación de *Dendrobii Herba* con agua o con un disolvente que contiene agua para obtener una disolución acuosa que contiene polisacáridos extraídos;
  - (d) mezclar la disolución acuosa que contiene los polisacáridos extraídos con un segundo alcohol para precipitar los polisacáridos; y
  - (e) recoger los polisacáridos precipitados.
- 20 6. El polisacárido de la reivindicación 5 para el uso de la reivindicación 1, en donde el primer alcohol es al menos uno seleccionado del grupo que consiste de metanol, etanol, y cualquier combinación de los mismos.
7. Los polisacáridos de la reivindicación 5 para el uso de la reivindicación 1, en donde la segunda preparación de *Dendrobii Herba* se extrae con agua.
8. Los polisacáridos de la reivindicación 5 para el uso de la reivindicación 1, en donde el segundo alcohol es etanol.
- 25 9. Los polisacáridos de la reivindicación 8 para el uso de la reivindicación 1, en donde el etanol tiene una concentración en el rango de 30 por ciento (p/v) a 70 por ciento (p/v), preferiblemente al menos de 50 por ciento (p/v).
10. Los polisacáridos extraídos de *Dendrobii Herba* para uso en la reducción de la remodelación de las vías respiratorias causada por inflamación.
11. El polisacárido de la reivindicación 10 para el uso de la reivindicación 10, en donde los polisacáridos se administran en forma oral.
- 30 12. Los polisacáridos de la reivindicación 10 para el uso de la reivindicación 10, en donde los polisacáridos se preparan por medio de un proceso que contiene las etapas de:
  - (a) remojar una primera preparación de *Dendrobii Herba* en un primer alcohol;
  - (b) remover el primer alcohol para producir una segunda preparación de *Dendrobii Herba*;
  - 35 (c) extraer la segunda preparación de *Dendrobii Herba* con agua o con un disolvente que contiene agua para obtener una disolución acuosa que contiene polisacáridos extraídos;
  - (d) mezclar la disolución acuosa con un segundo alcohol para precipitar los polisacáridos; y
  - (e) recoger los polisacáridos precipitados.

13. Los polisacáridos de la reivindicación 12 para el uso de la reivindicación 10, en donde el primer alcohol es al menos uno seleccionado del grupo que consiste de metanol, etanol, y cualquier combinación de los mismos.

14. Los polisacáridos de la reivindicación 12 para el uso de la reivindicación 10, en donde la segunda preparación de *Dendrobii Herba* se extrae con agua.

5 15. Los polisacáridos de la reivindicación 12 para el uso de la reivindicación 10, en donde el segundo alcohol es etanol.

16. Los polisacáridos de la reivindicación 12 para el uso de la reivindicación 10, en donde el etanol tiene una concentración en el rango de 30 por ciento (p/v) a 70 por ciento (p/v), preferiblemente al menos de 50 por ciento (p/v).

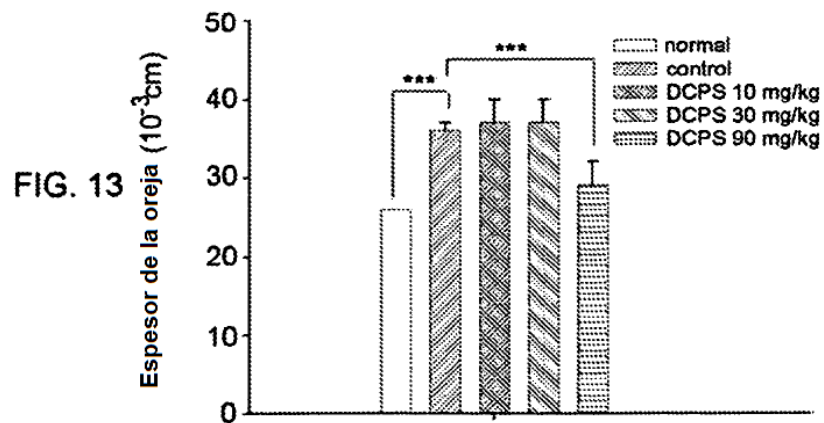
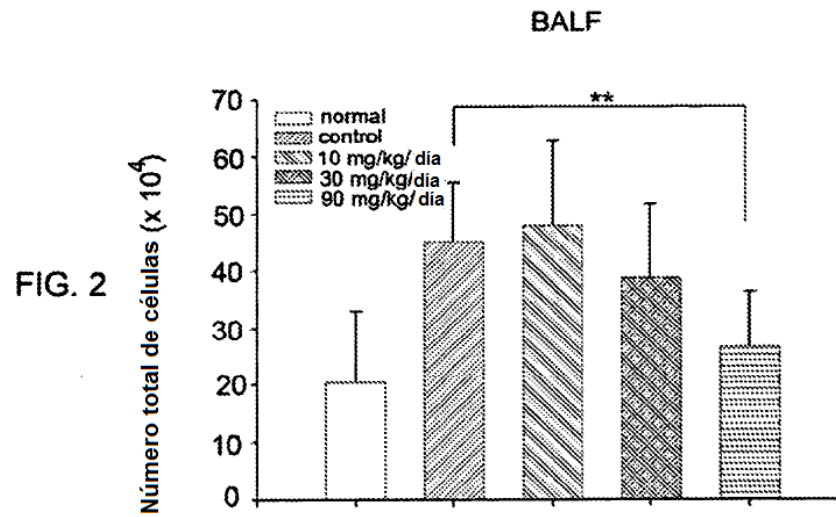
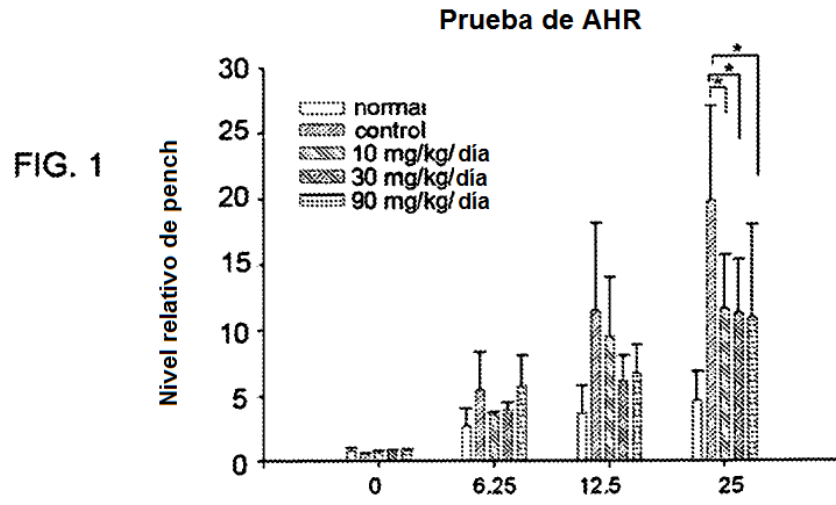


FIG. 3A

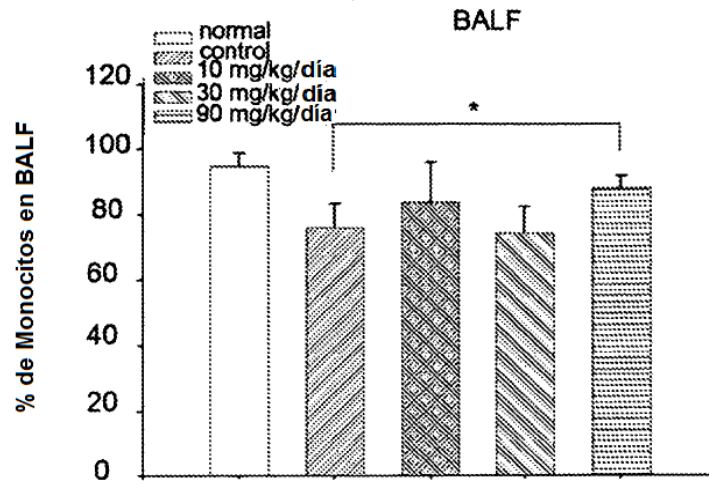


FIG. 3B

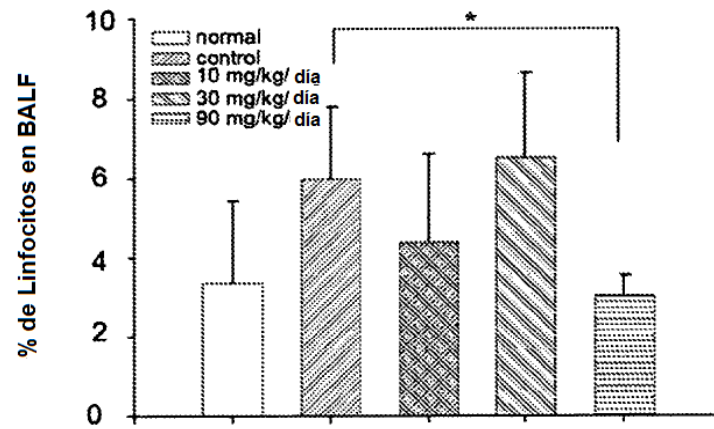
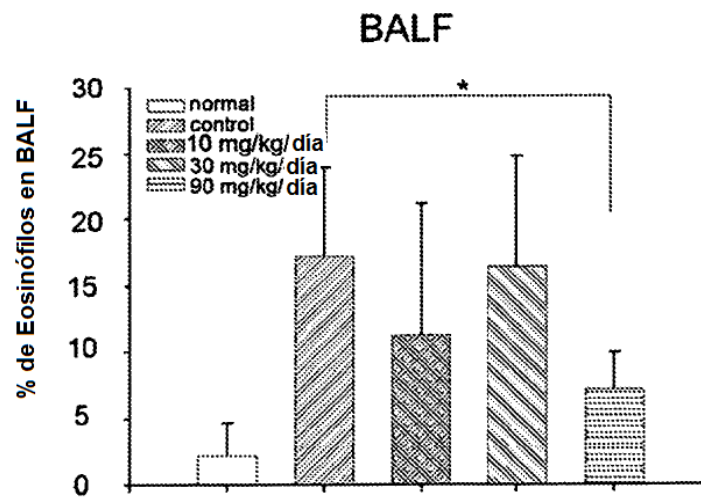


FIG. 3C



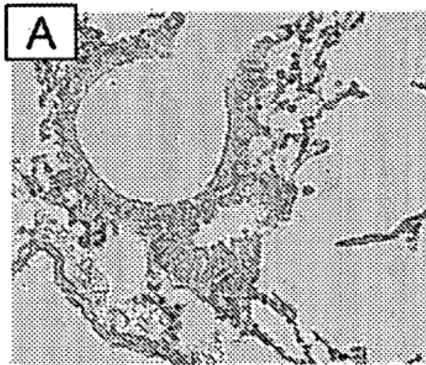


FIG. 4A

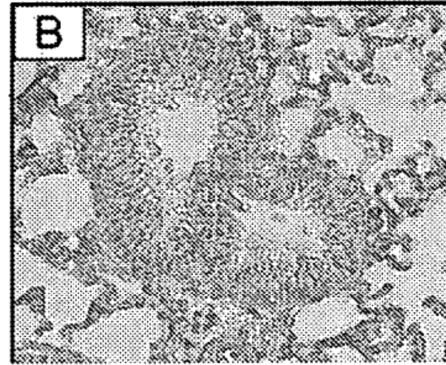


FIG. 4B

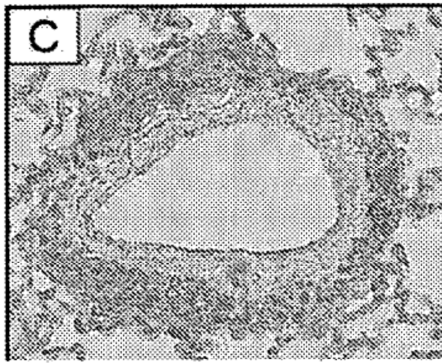


FIG. 4C

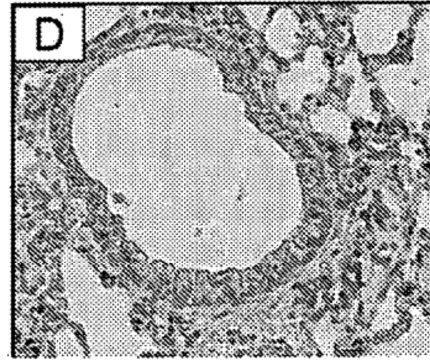


FIG. 4D

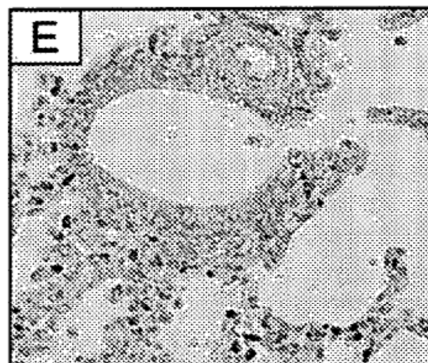


FIG. 4E

FIG. 5

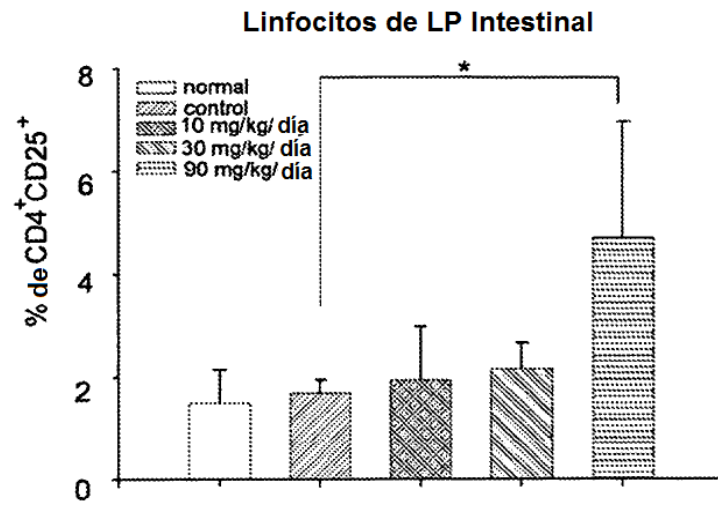


FIG. 6A

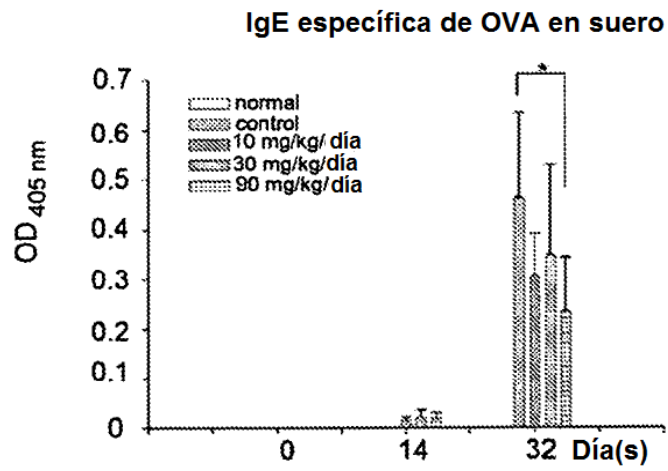
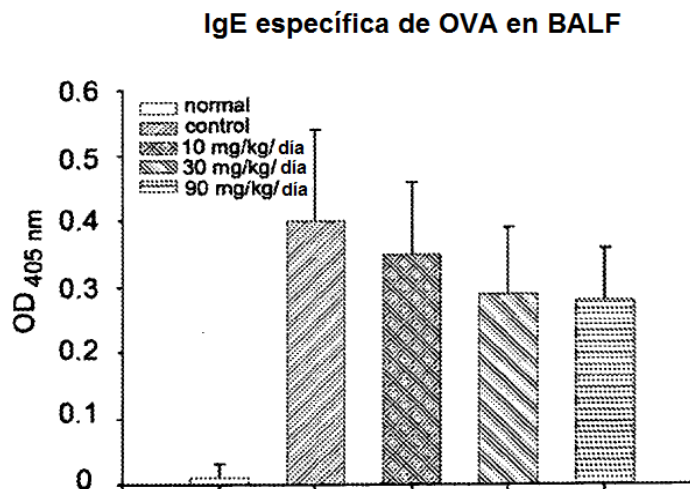
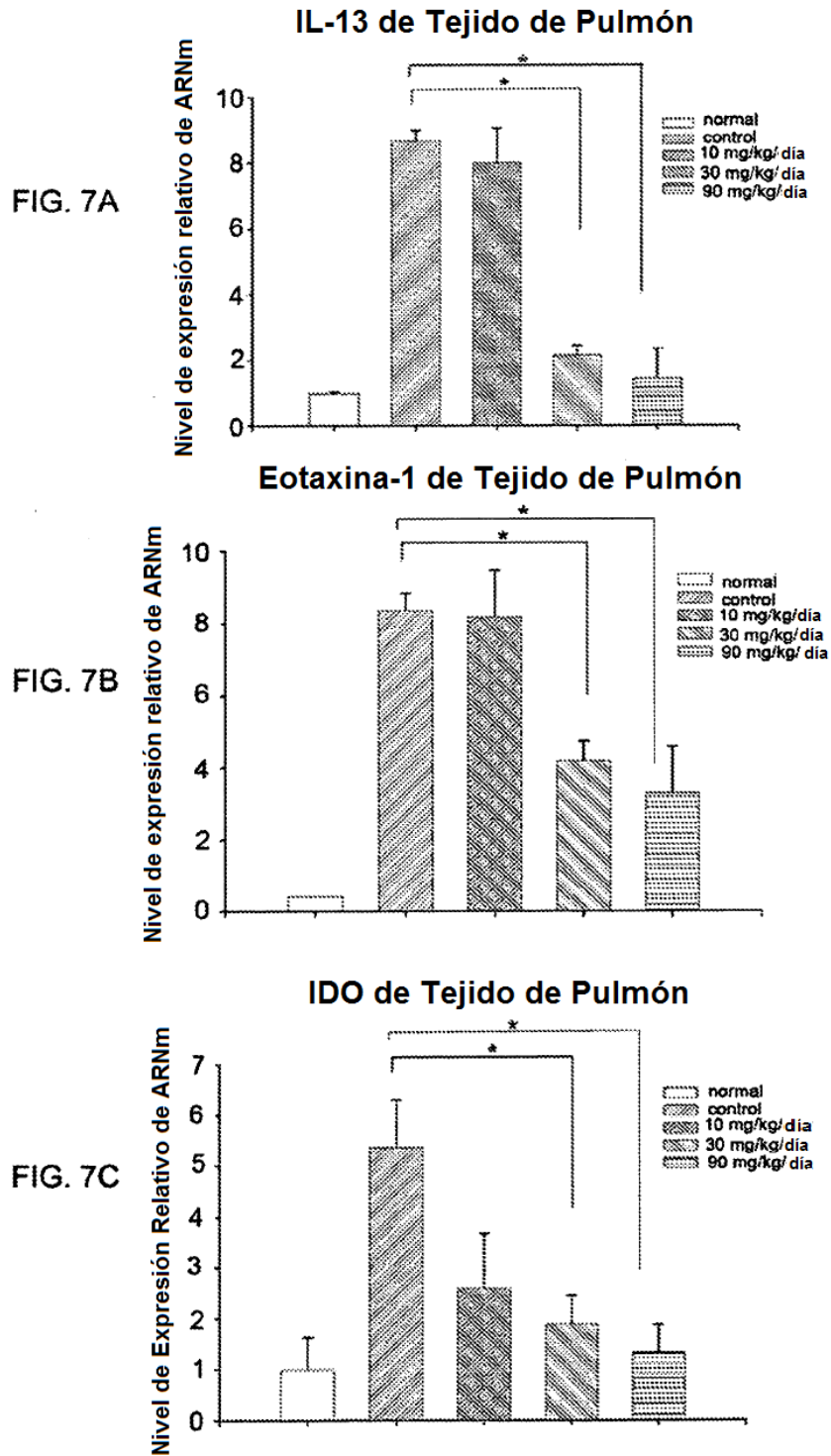


FIG. 6B





### IL-17 de Tejido de Pulmón

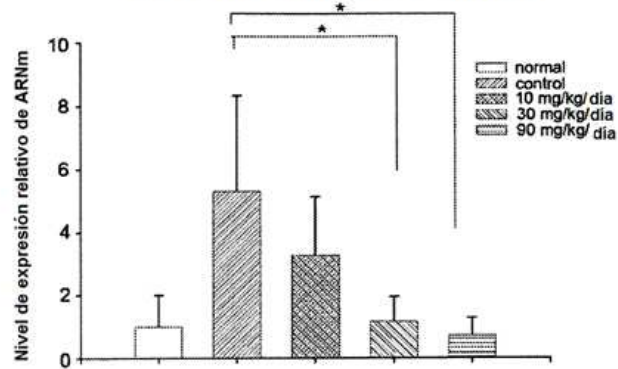


FIG. 7D

### TSLP de Tejido de Pulmón

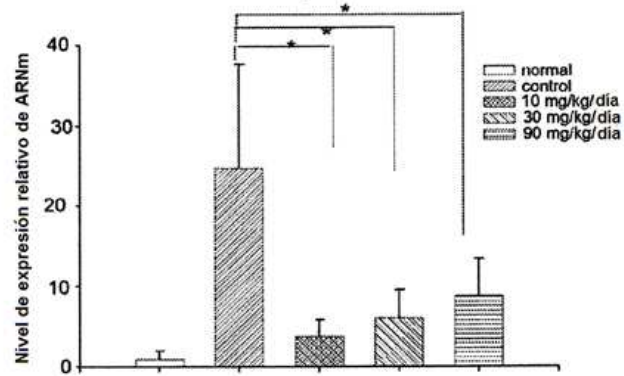


FIG. 7E

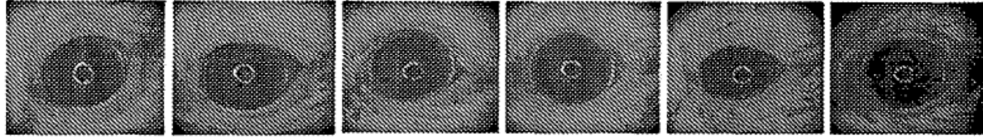


FIG. 8A

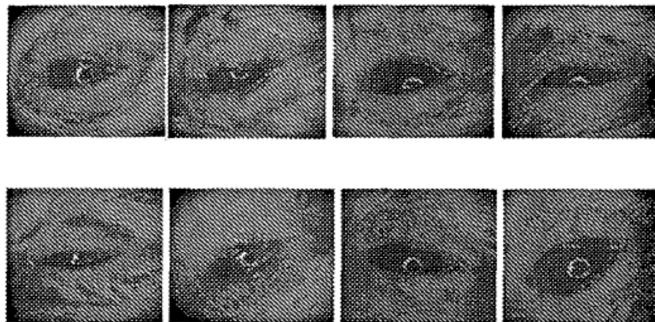


FIG. 8B

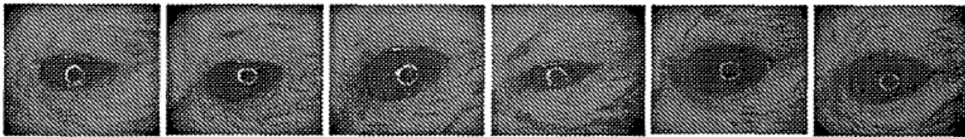


FIG. 8C

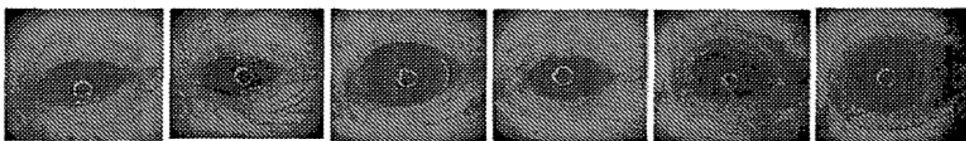


FIG. 8D

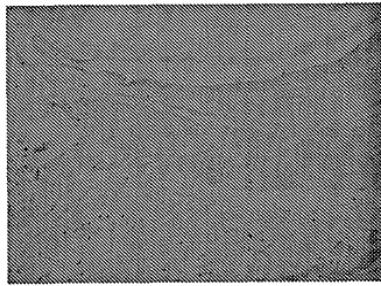
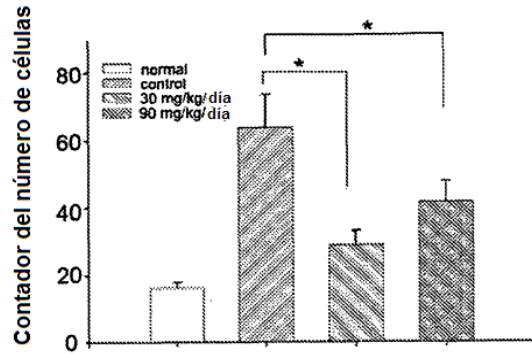
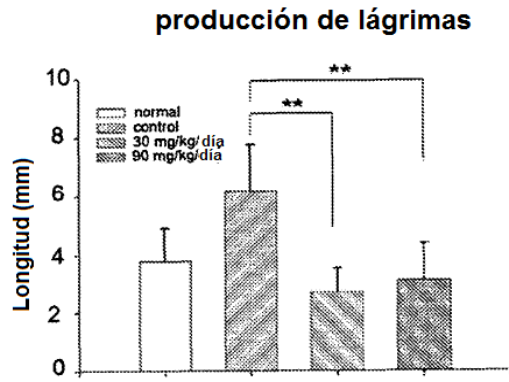


FIG. 10A



FIG. 10B

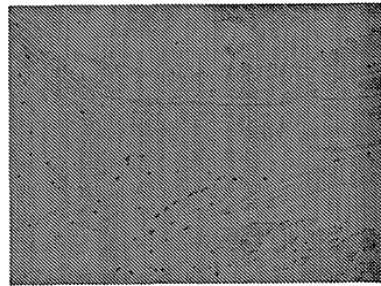


FIG. 10C

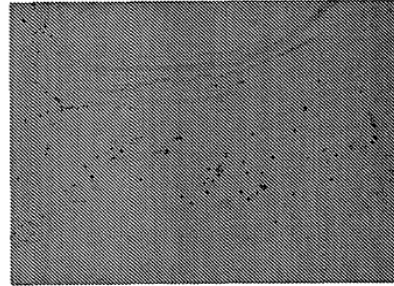


FIG. 10D

