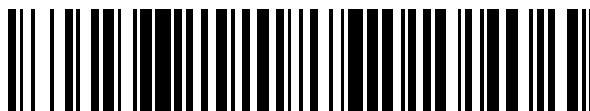


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 079**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2003** **E 11000805 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013** **EP 2329835**

54 Título: **Composición que comprende el extracto de Actinidia arguta y especies relacionadas para la prevención y el tratamiento de una enfermedad alérgica y una enfermedad inflamatoria no alérgica**

30 Prioridad:

**23.08.2002 US 405295 P**

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

**06.11.2013**

73 Titular/es:

**VIROMED CO., LTD. (100.0%)  
Building 203, College of Natural Science Seoul  
National University San 56-1, Sinlim-dong  
Gwanak-gu  
Seoul 151-747, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, BONGCHEOL;  
JIN, MIRIM;  
PARK, EUN-JIN;  
JUNG, HYUNG-JIN;  
SHIN, SUNG-SEUP;  
OH, JIN-HWAN;  
LEE, HWA-JUN;  
KIM, SUNYOUNG y  
JEONG, HYANG**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 428 079 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición que comprende el extracto de *Actinidia arguta* y especies relacionadas para la prevención y el tratamiento de una enfermedad alérgica y una enfermedad inflamatoria no alérgica.

5

**Antecedentes de la invención**Campo técnico

10 La presente invención se refiere a un extracto de *Actinidia arguta* y especies relacionadas y a una composición que incluye el mismo, con actividad preventiva y de tratamiento de enfermedades alérgicas.

Técnica anterior

15 Las enfermedades alérgicas tales como anafilaxia, rinitis alérgica, asma, dermatitis atópica, alergias alimentarias y urticaria, afectan hasta el 20% de la población en muchos países y están aumentando (Wuthrich B., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 90, pp 3-10, 1989).

20 Las enfermedades alérgicas son mediadas por la inmunoglobulina E (IgE), mientras que está demostrado que las células colaboradoras tipo 2T (Th2), las células cebadas y los eosinófilos juegan un papel importante en este proceso (Maggi E., Immunotechnology, 3, pp 233-244, 1998; Pawankar R., Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 1, pp 3-6, 2001; Vercelli D., Clin. Allergy Immunol., 16, pp 179-196, 2002).

25 Sin infección por helmintos o por otros estímulos, la IgE constituye normalmente uno de los isotipos inmunoglobulínicos que se encuentran en el suero humano, así como en varias especies de animales experimentales (Maggi E., Immunotechnology, 3, pp 233-244, 1998; Coffman RL and Carty J., J. Immunotechnology, 136, pp 949-954, 1986). Según la "hipótesis Th2", la producción de IgE es favorecida en situaciones inmunológicas en las que la inmunidad humoral mediada por las células Th2 y citocinas relacionadas tales como IL-4, IL-5 y IL-13, es predominante (Maggi E., Immunotechnology, 3, pp 233-244, 1998). El punto de vista habitual con respecto al  
30 progreso de las enfermedades alérgicas, es que factores genéticos y medioambientales interaccionan entre ellos, llevando a la producción de IL-4 a través de la vía de señalización mediada por Stag-6 y la activación de factores de transcripción específicos tales como c-Maf, GATA3, NIP45 y NFATc en las células originales T, y que dan lugar eventualmente al desarrollo de células colaboradoras 2 CD4+ alérgico específicas. Una vez generadas, las células Th2 activadas por alérgenos secretan IL-4, IL-5 y IL-13. IL-4 y IL-5, inducen la producción de IgE y IgG1 por las  
35 células B, así como la estimulación del desarrollo de eosinófilos en la médula ósea y su reclutamiento en los tejidos inflamados (Erb K. J.; Immunol. Today, 20, pp 317-322, 1999; Rothenberg ME., N. Engl. J. Med., 338, pp 1.592-1.600, 1998). La IL-13 es una citocina estrechamente relacionada con IL-4, y se une a la cadena alfa del receptor de éste, induciendo fenotipos alérgicos, de forma independiente de IL-4 y IgE o eosinófilos (Wills-Karp M., et al., Science, 282, pp 2.258-2.261, 1998; Grunig G., et al., Science, 282, pp 2.261-2.263, 1998).

40 El IgE circulante se asocia a dos isoformas de receptores IgE: receptores IgE de alta afinidad (FcεRI) presentes en la superficie de células cebadas y basófilos, y receptores IgE de escasa afinidad (FcεRII y CD23), que se encuentran en la superficie de linfocitos, eosinófilos, plaquetas y macrófagos. Se cree que el factor más importante que controla la patogénesis de las alteraciones alérgicas es el entrecruzamiento de los receptores IgE sobre las células cebadas,  
45 después del encuentro de los alérgenos y la desgranulación consiguiente de las células cebadas. Las moléculas liberadas por las células cebadas incluyen histamina, heparina, proteasas y radicales libres, que median diversos efectos biológicos que incluyen vasodilatación, contracción de los músculos lisos bronquiales y/o intestinales, secreción mucosa y proteólisis local. Después de la reacción inmediata inicial de las células cebadas, tiene lugar entre 6 y 24 horas más tarde, un flujo de eosinófilos, basófilos y linfocitos. Esta respuesta de fase tardía puede llevar  
50 a una inflamación tisular crónica expuesta continuamente a los antígenos.

Los medicamentos convencionales para el tratamiento de las alteraciones alérgicas incluyen antihistaminas, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos o esteroideos, y antagonistas leucotriénicos. Estos medicamentos son principalmente útiles para los efectos sintomáticos, pero no proporcionan la cura fundamental que se requiere  
55 para las enfermedades alérgicas, tal como el alivio de la excesiva inmunidad humoral o la supresión de la producción de IgE. La hipótesis de que la reducción del nivel sérico de IgE puede mejorar los síntomas alérgicos, se demostró mediante ensayos clínicos del anticuerpo quimérico anti-IgE ((CGP-51901) y del anticuerpo monoclonal recombinante humanizado (rhuMAB-E25) (Fahy JV et al., Am. J. Respir. Crit. Care. Med., 155, pp 1.828-1.834, 1997). Análogos diacil bencimidazólicos y polisacáridos bacterianos que inhiben la síntesis y secreción de IgE, se han escrito, respectivamente, en la patente US nº 6.369.091 y la solicitud de patente US 20020041885.

60 El único procedimiento para el tratamiento fundamental de las alergias es llevar a cabo terapias de desensibilización o inmunoterapia. Ésta es el procedimiento de tratamiento que reduce la hipersensibilidad al origen alérgico y mejora los síntomas alérgicos administrando alérgenos depurados durante largo tiempo a los pacientes alérgicos, aumentando gradualmente la dosis. Después de su introducción en 1911, la inmunoterapia se ha utilizado para el tratamiento de patologías alérgicas tales como rinitis alérgica, asma alérgica, veneno de abeja y similares, utilizando

un anticuerpo IgE antígeno específico. Aunque el mecanismo más importante que reduce la hipersensibilidad no se ha descubierto todavía claramente, se sabe que el aumento de la concentración de IgG, mientras se disminuye la concentración de IgE, induce la reacción inmunitaria normal.

5 La *Actinidia arguta*, *A. polygama*, y *A. kolomikta* pertenecientes a las Actinidiaceae, se distribuyen en Siberia, el área norte de China, y el Norte y Sur de Corea. Se ha informado de más de 30 especies que pertenecen a las Actinidiaceae. Entre éstas, el fruto de *A. chinensis* y *A. deliciosa* o *Actinidia arguta* se ha llamado kiwi y otros frutos del mismo género se han utilizado como materiales de la medicina china denominada como "mihudo" para el tratamiento sin toxicidad de enfermedades hepáticas, gastrointestinales y la litiasis urogenital (Seoul National University Natural Products Science, Tradi-Medi Data Base, dongbang media Co. Ltd. 1999). Sin embargo, no ha habido informes o sugerencias con respecto al tratamiento y prevención de enfermedades alérgicas e inflamatorias no alérgicas utilizando el fruto de *Actinidia*.

15 Mientras, se han concentrado esfuerzos para investigar productos naturales antiinflamatorios y antialérgicos efectivos.

La solicitud de patente coreana nº 92-11752 dio a conocer un medicamento antiinflamatorio, antialérgico y antirreumático que incluye un biflavonoide tal como la 4'-O-metil ocnaflovona, aislada de *Lonicera japonica*, que muestra actividad para el tratamiento de diversas inflamaciones o alergias. El registro de la patente coreana nº 100744 dio a conocer un medicamento antiinflamatorio, antialérgico y antirreumático, que incluye varios compuestos biflavonoides aislados de las hojas de *Ginkgo biloba*. Se ha informado de que varias fórmulas de medicina oriental que incluyen *Siegesbeckia glabrescens* presentan una actividad reductora de IgE (Kim H.M. et al., *Phytother. Res.*, 15, pp572-576, 2001). Además, se ha descubierto que grandes cantidades de hierbas medicinales constituyen fuentes ricas de inhibidores de la liberación histamínica, o de medicamentos antiinflamatorios.

25 Sin embargo, no se ha informado de o se han dado a conocer acciones antiinflamatorias y antialérgicas de extractos del fruto del kiwi, en cualquiera de las publicaciones anteriormente citadas.

30 Para investigar medicamentos antialérgicos y antiinflamatorios entre las hierbas de China, en el contexto de la presente invención se han llevado a cabo *in vivo* o *in vitro*, de forma intensa, experimentos con respecto a los efectos del extracto del fruto endurecido de kiwi sobre el cambio de citocinas Th1/Th2 y de los subtipos IgE e IgG en el suero humano, así como también del ensayo de inhibición de la liberación de histamina a partir de las células cebadas peritoneales murinas y el ensayo del edema de las pezuñas de la rata.

### 35 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un alimento para la salud que comprende el extracto en bruto o el extracto soluble en un disolvente no polar de *Actinidia arguta*, *Actinidia kolomikta* o *Actinidia polygama*, junto con un aditivo sitológicamente aceptable, para utilizarlos en la prevención o mejora de la enfermedad alérgica.

40 En una forma de realización, el extracto se prepara utilizando cualquiera de los frutos, tallos o raíces de *Actinidia arguta*, *Actinidia kolomikta* o *Actinidia polygama*.

45 En una forma de realización, dicha enfermedad alérgica comprende anafilaxis, rinitis alérgica, asma, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis contagiosa, urticaria, alergia a los insectos, alergia alimentaria, y alergia a los medicamentos.

50 En una forma de realización, dicho extracto en bruto es soluble en disolventes polares seleccionados a partir de agua destilada, alcoholes inferiores, o sus mezclas.

En una forma de realización, dicho extracto en bruto es soluble en agua destilada o en etanol al 70%.

55 En una forma de realización, la cantidad de dicho extracto está comprendida entre 0,01 y 80% en peso, sobre la base del peso total de la composición.

La presente invención proporciona también un aditivo alimenticio que incluye el extracto en bruto de *Actinidia arguta*, *Actinidia kolomikta* o *Actinidia polygama*, para utilizarlo en la prevención o mejora de las enfermedades alérgicas.

60 En una forma de realización, dicho extracto en bruto comprende, por lo menos, uno seleccionado a partir de lactosa, caseína, dextrina, glucosa, sacarosa y adicionalmente, sorbitol.

En una forma de realización, la proporción de tales aditivos está comprendida entre aproximadamente 0 a 20 peso/peso por 100% peso/peso de la presente composición.

65 En una forma de realización, dicho aditivo alimenticio puede añadirse al alimento por un procedimiento de deposición, pulverización o mezcla.

La presente invención proporciona asimismo un aditivo para pienso que comprende el extracto en bruto de *Actinidia arguta*, *Actinidia kolomikta* o *Actinidia polygama*, para utilizarlo en la prevención o el tratamiento de las enfermedades alérgicas en los animales.

5 En una forma de realización, dicho extracto en bruto es soluble en un disolvente polar seleccionado a partir de agua destilada, alcoholes inferiores tales como etanol, metanol, butanol o sus mezclas.

En una forma de realización, dicho aditivo para pienso se proporciona como líquido, polvo o gránulo.

10 En una forma de realización, dichos aditivos para pienso pueden añadirse al pienso mediante un procedimiento de depósito, pulverización o mezcla.

La presente invención proporciona también una composición para pienso que comprende cualquiera de los aditivos para pienso que se han expuesto anteriormente, para su utilización en la prevención o mejora de la enfermedad alérgica.

### Exposición de la invención

20 Las enfermedades alérgicas anteriormente descritas o las enfermedades alérgicas dérmicas incluyen la anafilaxis, rinitis alérgica, asma, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis contagiosa, urticaria, alergias debidas a insectos, alergias alimentarias y alergias medicamentosas.

Los frutos endurecidos del kiwi anteriormente descritos pueden incluir *Actinidia arguta*, *A. kolomikta* o *A. polygama* y los mismos géneros de plantas, pudiendo utilizarse sus frutos, tallos y raíces.

25 El extracto en bruto anteriormente citado del fruto del kiwi, pueden obtenerse utilizando agua, alcoholes inferiores tales como metanol, etanol y similares, o sus mezclas, preferentemente agua destilada, o un extracto soluble de etanol al 70%, y los extractos solubles en disolventes no polares anteriormente mencionados, pueden obtenerse utilizando disolventes no polares tales como hexano, acetato de etilo o un disolvente diclorometánico.

30 Los alimentos para la salud de la presente invención comprenden los extractos anteriormente mencionados del 0,01 al 80%, preferentemente del 1 al 50% en peso, basado en el peso total de la composición.

35 Los alimentos para la salud anteriormente mencionados, pueden estar contenidos en alimentos para la salud, bebidas para la salud, etc., y pueden utilizarse como polvos, gránulos, comprimidos, comprimidos masticables, cápsulas, bebidas, etc.

Un extracto de frutos endurecidos de kiwi de la invención, puede prepararse detalladamente mediante el procedimiento siguiente.

40 El fruto de kiwi se seca y fragmenta, mezclándolo con 5 a 25 veces, preferentemente; aproximadamente con 10 volúmenes de agua destilada, y alcoholes inferiores tales como metanol, etanol, butanol y similares, o de sus mezclas, preferentemente agua o etanol al 70%, se trata la solución con agua caliente a temperaturas entre 20 y 100°C, preferentemente entre 60 y 100°C, durante 1 a 24 horas, con un procedimiento extractor con agua caliente, agua fría, extracción mediante reflujo, o por tratamiento mediante ultrasonidos de forma seguida, 1 a 5 veces, preferiblemente de 2 a 3 veces; filtrándose el residuo para obtener el sobrenadante, que se concentrará mediante un evaporador rotatorio, a una temperatura entre 20 y 100°C, preferentemente entre 50 a 70°C, y secado e ntonces mediante liofilización al vacío, secado por aire caliente o pulverización, para obtener un extracto en bruto, seco, en polvo, del fruto del kiwi, que puede solubilizarse en agua, alcoholes inferiores, o sus mezclas.

50 El extracto en bruto anteriormente mencionado del fruto endurecido del kiwi se almacena a -20°C para utilizarlo como una mezcla, disolviéndolo en agua destilada para ajustarlo a cierta concentración.

Además, el extracto soluble en un disolvente no polar de la presente invención, puede prepararse mediante el procedimiento siguiente: el extracto en bruto preparado en la etapa anterior, se suspende en agua, mezclándose entonces con entre 1 y 100 volúmenes, preferentemente, 1 y 5 volúmenes de un disolvente no polar tal como acetato de etilo, cloroformo, hexano y similares; la capa de disolvente soluble no polar se recupera para obtener un extracto soluble de disolvente no polar de la presente invención.

60 Asimismo, los procedimientos anteriormente descritos pueden modificarse o someterse a una posterior etapa, para fraccionar o aislar para obtener fracciones o compuestos más efectivos, mediante el procedimiento bien conocido en la técnica, que se da a conocer en la literatura (Harborne J.B., *A guide to modern techniques fo plant analysis*, 3ª Ed. pp 6-7, 1998).

65 Para investigar la actividad antialérgica y antiinflamatoria del extracto endurecido del fruto de kiwi preparado mediante el procedimiento anterior, se llevaron a cabo experimentos *in vivo* e *in vitro* tales como el método ELISA

para determinar el nivel de citocinas Th1/Th2 y los subtipos IgE e IgG en el suero, el ensayo de inhibición de la liberación de histamina a partir de las células cebadas, y el ensayo antiinflamatorio para probar los efectos del extracto de la invención, confirmándose entonces que éste muestra un efecto antialérgico y antiinflamatorio excelente.

5 Específicamente, la reducción de la IgE alérgeno específica y el aumento de la IgG2 a alérgeno específica ha constituido el objetivo principal en el campo inmunoterápico, el único tratamiento fundamental actual de las enfermedades alérgicas, confirmándose, por tanto, mediante los anteriores experimentos, que el endurecido fruto del kiwi puede aumentar la eficiencia para el tratamiento, si se utiliza con la inmunoterapia como una ayuda para la inmunoterapia alérgica.

Una composición para tratar y prevenir las enfermedades alérgicas, puede incluir los extractos anteriormente mencionados entre el 0,01 ~ 50% en peso, basado en el peso total de la composición.

15 La composición puede incluir además un transportador convencional, adyuvantes o diluyentes de acuerdo con el procedimiento utilizado convencionalmente en la técnica.

La composición puede proporcionarse como una composición farmacéutica que contiene transportadores farmacéuticamente aceptables, adyuvantes o diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, polivinil pirrolidona, agua, benzoato metilhidroxilo, benzoato propilhidroxilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente agentes de relleno, agentes antiaglutinantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes saborizantes, emulsionantes, conservantes y similares. Las composiciones pueden formularse de forma que proporcionen una liberación rápida, sostenida o con retraso del principio después de su administración a un paciente, utilizando cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica.

Por ejemplo, las composiciones pueden disolverse en aceites, propilenglicol o en otros disolventes que se utilizan habitualmente para producir una inyección. Los ejemplos apropiados de los transportadores incluyen soluciones fisiológicas salinas, polietilenglicol, aceites vegetales, miristato de isopropilo, etc., pero no se limitan a ellos. Para la administración tópica, los compuestos pueden formularse en forma de pomadas y cremas.

Las formulaciones farmacéuticas que contienen esta composición, pueden prepararse en cualquier forma, tal como en formas de dosificación oral (polvos, comprimidos, cápsulas, cápsulas blandas, medicamentos acuosos, jarabes, píldoras de elixir; polvos, saquitos, gránulos) o preparaciones tópicas (cremas, pomadas, lociones, geles, bálsamos, parches, pastas, soluciones pulverizantes, aerosoles y similares), o preparaciones inyectables (soluciones, suspensiones, emulsiones).

La composición en las formas de dosificación farmacéutica puede utilizarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, y, asimismo, pueden emplearse solas o en una asociación apropiada, así como en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos.

La dosis deseable del extracto o composición varía, dependiendo de la situación y peso del individuo, gravedad, forma del medicamento vía y tiempo de administración y puede seleccionarse por los expertos en la materia. Sin embargo, para obtener efectos deseables se recomienda generalmente administrar el extracto o la composición en una cantidad oscilante a los 10 g/kg, preferentemente, entre 1 a 3 g/kg de peso al día, del extracto. La dosis puede administrarse de una vez, o dividirse en varias tomas al día. En términos de composición, la cantidad del extracto deberá encontrarse entre el 0,01 y el 95% en peso, preferentemente entre el 0,5 g y el 80% en peso, basada en el peso total de la composición.

La composición farmacéutica puede administrarse a un sujeto animal tal como un mamífero (rata, ratón, animal doméstico o individuo) a través de distintas vías. Se consideran todos los modos de administración, por ejemplo, ésta puede llevarse a cabo por vía oral, rectal o intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracutánea, intrafecal, epidural o intracerebroventricular.

La presente invención proporciona una composición de una bebida alimentaria para la salud para la prevención y mejora de las enfermedades alérgicas, añadiendo el fruto endurecido de kiwi entre el 0,01 y el 20% en peso, entre el 0,001 y el 5% en peso de aminoácidos, entre el 0,001 y el 2% en peso de vitaminas, entre el 0,001 y el 20% en peso de azúcares, entre el 0,001 y el 10% de ácidos orgánicos, y edulcorantes y saborizantes en cantidad apropiada.

El extracto del fruto endurecido del kiwi anteriormente mencionado puede añadirse a los alimentos y bebidas, para la prevención y mejora de las enfermedades alérgicas.

Para desarrollar alimentos para la salud, constituyen ejemplos de alimentos que pueden añadirse, que incluyen los extractos anteriormente mencionados de la presente invención, varios alimentos, bebidas, gomas, complejos vitamínicos, alimentos que mejoren la salud y similares, pudiéndose utilizar como polvos, gránulos, comprimidos,

comprimidos masticables, cápsulas o bebidas, etc.

Asimismo, el extracto de la presente invención podrá prevenir y mejorar las enfermedades alérgicas y las inflamatorias no alérgicas, incluyendo los alimentos infantiles, tales como la leche en polvo modificada, la leche en polvo modificada para el período de crecimiento, y los alimentos modificables para el período de crecimiento.

La composición anteriormente descrita puede añadirse a los alimentos, aditivos o bebidas, en los que la cantidad del extracto anteriormente descrito en los alimentos o bebidas puede oscilar generalmente entre 0,1 y 95% peso/peso, preferentemente entre 1 y 80% peso/peso del peso total del alimento para la composición del alimento para la salud y entre 1 y 30 g, preferentemente entre 3 y 10 g en la proporción de 100 ml de la composición de la bebida para la salud.

A condición de que las composiciones de bebidas para la salud de la presente invención contengan el extracto descrito anteriormente como un componente esencial en la proporción indicada, no existe una limitación particular sobre el otro componente líquido, donde los otros componentes pueden consistir en diversos hidratos de carbono naturales o desodorantes, tales como bebidas convencionales. Los ejemplos de los hidratos de carbono naturales mencionados anteriormente son monosacáridos tales como glucosa, fructosa, etc.; disacáridos tales como maltosa, sacarosa, azúcares convencionales tales como dextrina, ciclodextrina; y alcoholes azucarados tales como xilitol, eritritol, etc. Como distintos desodorantes a los anteriormente mencionados, pueden utilizarse favorablemente desodorantes naturales tales como taumatina, extracto de estevia tal como levandióxido A, gliciricina et al, y desodorantes sintéticos tales como sacarina, aspartano et al. La cantidad de los hidratos de carbono naturales descritos anteriormente oscila generalmente entre 1 y 20 g, preferentemente entre 5 y 12 g, en la proporción de 100 ml de esta composición bebible.

Los otros componentes en la composición anteriormente mencionada son diversos nutrientes, una vitamina, un mineral o un electrólito, un agente saborizante sintético, un agente colorante, y un agente de mejora en el caso de chocolate con queso y otros, ácido péctico y su sal, ácido alginico y su sal, un ácido orgánico, un adhesivo coloidal protector, un agente que controle el pH, un estabilizante, un conservante, glicerina, alcohol, un agente carbonizante utilizado en las bebidas carbónicas y otros. El otro componente anteriormente mencionado puede ser el jugo de fruta para preparar el jugo de fruta natural, la bebida de jugo de fruta y la bebida vegetal, en la que el componente puede utilizarse independientemente o en combinación. La proporción de los componentes no es tan importante, pero oscila generalmente entre 0 y 20% peso/peso por 100% peso/peso de la composición. Los ejemplos de alimentos que pueden añadirse que incluyen el extracto anteriormente mencionado, son varios alimentos, bebidas, gomas, complejos vitamínicos, alimentos que mejoran la salud y similares.

La composición de la invención puede incluir adicionalmente uno o más ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico, ácido fumárico, ácido adípico, ácido láctico, ácido málico; fosfatos, tales como fosfato, fosfato sódico, fosfato potásico, pirofosfato ácido, polifosfato; antioxidantes naturales tales como polifenoles, catequinas,  $\alpha$ -tocoferol, extracto de romero, vitamina C, extracto de té verde, extracto de raíz de regaliz, quitosán, ácido tánico, ácido fítico, etc.

El extracto anteriormente mencionado del fruto endurecido del kiwi, puede consistir en un líquido, polvo o gránulo concentrado entre el 20 y el 90%.

De modo similar, el extracto mencionado del fruto endurecido del kiwi puede incluir adicionalmente una o varias lactosas, caseínas, dextrosas, glucosas, sacarosas y sorbitol.

Se describe también un procedimiento de utilización de los aditivos alimenticios, tal como la esterilización, las especias, aderezos, varios nutrientes, vitaminas, un mineral o un electrolito, un agente saborizante sintético, un agente colorante y un agente de mejora en el caso de chocolate con queso y otros, ácido péctico y su sal, ácido alginico y su sal, un ácido orgánico, un adhesivo coloidal protector, un agente que controla el pH, un estabilizante, un conservante, glicerina, alcohol, un agente carbonizante utilizado en las bebidas carbónicas y otros o como un componente esencial de materiales comestibles.

En el que los aditivos alimenticios pueden añadirse a los alimentos mediante deposición, pulverización o mezclado, no siendo la proporción de los aditivos tan importante, oscilando generalmente entre 0,01 y 20% peso/peso, por un 100% peso/peso de la presente composición. Existen ejemplos de alimentos que pueden añadirse que incluyen los extractos anteriormente mencionados.

En el que los aditivos pueden añadirse a o sobre alimentos tales como frutos, vegetales, alimentos deshidratados o productos de corte tales como frutos, vegetales; jugos de frutas, jugos vegetales o sus mezclas; bebidas de tipo ácido; pastelería tal como bizcochos, dulces, caramelos, gomas, panes; helados, té, leche fermentada tal como yogurt; productos lácteos, especias, bebidas alcohólicas, latas, en botellas, fideos, productos procesados del ganado, productos procesados marinos, alimentos fermentados, alubias, cereales, carnes procesadas, regaliz o núcleos.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporcionan piensos o aditivos para pienso que incluyen esencialmente dicho extracto, preparado mediante el procedimiento de preparación anterior, para la prevención y mejora de las enfermedades alérgicas.

5 Los aditivos alimenticios anteriormente mencionados se caracterizan por una cantidad mezclada de 5 a 100 g por 1 kg de peso, basado en el peso seco total del alimento.

Además, la presente invención proporciona una composición para pienso que incluye los aditivos para pienso anteriormente mencionados.

10 La presente invención da a conocer asimismo una composición cosmética que incluye una cantidad efectiva del extracto en bruto o del extracto soluble en un disolvente no polar del fruto endurecido del kiwi, para la prevención y mejora de la enfermedad alérgica o de las enfermedades inflamatorias no alérgicas.

15 La presente composición cosmética proporciona una composición cosmética que incluye los extractos anteriormente mencionados con un peso de la composición de la invención de entre el 0,01 al 30%, más preferentemente del 0,01 al 5%, basado en el peso total de la composición, para el tratamiento, prevención y mejora de las enfermedades alérgicas dérmicas y de las enfermedades dérmicas inflamatorias no alérgicas.

20 Los otros componentes, pueden constituir una mezcla de los principios activos de una composición cosmética convencional bien conocida en la técnica.

25 Las formulaciones cosméticas que contiene la composición anterior pueden prepararse en cualquier forma, tal como revestimientos, lociones, cremas, perfumes, colorantes, emulsiones, parches, jabones, champús, enjuagues, limpiadores, soluciones de lavado corporal, soluciones de lavado, tratamientos, geles, ungüentos, solución de pulverización y similares.

30 La composición cosmética puede incluir otros aditivos seleccionados del grupo formado por vitaminas solubles en agua, vitaminas solubles en lípidos, polímeros, peptídicos, polímeros polisacáridos, esfingolípidos y extractos de algas.

35 Las vitaminas preferibles solubles en agua son cualquiera que puedan mezclarse con cosméticos, sin embargo, diversas vitaminas como B1, B2, B6, piridoxina, clorhidrato de piridoxina, vitamina B12, ácido pantoténico, ácido nicotínico, nicotinamida, ácido fólico, vitamina C, vitamina H, etc., sus sales tales como la sal clorhidrato de tiamina, la sal sódica del ácido ascórbico, etc., o sus derivados tales como la sal sódica del ácido ascórbico-2-fosfónico, la sal magnésica del ácido ascórbico-2-fosfónico, son preferibles y pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales como el procedimiento microbiano de conversión, el procedimiento de purificación a partir de los cultivos microbianos, el procedimiento enzimático o el de síntesis química.

40 Las vitaminas preferibles solubles en lípidos son cualesquiera que puedan mezclarse con cosméticos, sin embargo, varias vitaminas tales como A, D2, D3, E (dl- $\alpha$ -tocoferol, d- $\alpha$ -tocoferol, d- $\delta$ -tocoferol) y sus derivados tales como el ascorbato del ácido palmítico, ascorbato del ácido esteárico, ascorbato del ácido dipalmítico, ácido acético dl- $\alpha$ -tocoferol, ácido nicotínico dl- $\alpha$ -tocoferol vitamina E, alcohol dl-pantotenílico, alcohol D-pantotenílico eterélico, pantotenílico que contienen la vitamina soluble en lípidos que se utiliza en los ejemplos de la presente invención, son preferibles y pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales tales como el procedimiento microbiano de conversión, el de purificación a partir de cultivos microbianos, el enzimático, o el de síntesis química,.

50 Los polímeros peptídicos preferibles son cualesquiera que puedan mezclarse con cosméticos, sin embargo, el colágeno, el colágeno capaz de hidrolizarse, la gelatina, elastina, la gelatina hidrolizable, la queratina, etc., que contienen el polímero peptídico que se utiliza en los ejemplos de la presente invención, son preferibles.

55 Los polímeros polisacáridos preferidos son cualesquiera que puedan mezclarse con los cosméticos, siendo, sin embargo, preferidos, la hidroxietil celulosa, goma de xantin, ácido hialurónico sódico, sulfato de condroitina o su sal (sal Na, etc.), y similares. Por ejemplo, el sulfato de condroitina o su sal, etc., puede utilizarse purificándola ordinariamente a partir de mamíferos o pescados.

60 Los esfingolípidos preferibles son cualesquiera que pueda mezclarse con cosméticos, siendo sin embargo, preferibles la ceramida, la pit-esfingosina, el esfingolipopolisacárido y similares. El esfingolípido puede obtenerse purificándolo a partir de mamíferos, pescados, marisco, levaduras o vegetales, etc., en el procedimiento convencional.

65 El extracto de algas preferible es cualquiera que pueda mezclarse con cosméticos, siendo, sin embargo, preferibles, los extractos de algas pardas, algas rojas, algas verdes y similares, o la carrageenina, el ácido algínico, el ácido orgánico sódico y potásico aislados de ellas. El extracto de algas puede obtenerse purificándolo de las algas marinas en el procedimiento convencional.

La composición cosmética puede combinarse con otros ingredientes, combinados a su vez con la composición cosmética convencional, si es necesario, junto con ingredientes esenciales anteriormente descritos.

5 Otros ingredientes preferibles anteriormente descritos pueden incluir los oleosos, los humectantes, emolientes, agentes activos superficiales, colorantes orgánicos o inorgánicos, polvos orgánicos, agentes absorbentes de rayos ultravioleta, conservantes, antisépticos, antioxidantes, extractos vegetales, controladores de pH, alcohol, pigmentos, perfumes, refrigerantes, circulantes sanguíneos, antihidróxicos, agua destilada, etc.

10 Los ingredientes oleicos preferibles pueden incluir aceites estéricos, aceites de hidrocarburos, aceites de silicona, aceites fluoruros, aceites animales, aceites vegetales y así sucesivamente.

15 Los aceites estéricos preferibles que se han descrito anteriormente pueden incluir ácido glicerol tri-2-etil hexanoico, ácido mirístico isopropilo, ácido mirístico butilo, ácido palmítico isopropilo, ácido esteárico etilo, ácido palmítico octilo, ácido isoesteárico isocetilo, ácido butil esteárico, ácido etil linoleico, ácido isopropil linoleico, ácido etil oleico, ácido isocetil mirístico, ácido isoestearil mirístico, ácido isoestearil palmítico, ácido octildodecil mirístico, ácido isoesteárico isocetil, ácido dietil sebácico, ácido adípico, ácido isoalquil neopetanoico, gliceril tri(caprilo, ácido cáprico), ácido trimetilpropano tri-2-etil hexanoico, ácido trimetilpropano triisosteárico, ácido pentaeritritol tetra-2 etil hexanoico, ácido cetil caprílico, ácido decil láurico, ácido hexil láurico, ácido decil mirístico, ácido miristil mirístico, ácido cetil mirístico, ácido estearil esteárico, ácido decil oleico, ácido cetil linoleico, ácido isoestearil láurico, ácido isotridecil mirístico, ácido isocetil palmítico, ácido octil esteárico, ácido isocetil esteárico, ácido isodecil oleico, ácido octildodecil oleico, ácido octil dodecil linoleico, ácido isopropil isoesteárico, ácido cetosteárico 2-etil hexanoico, ácido estearil 2-etil hexanoico, ácido hexil isoesteárico, ácido etilenglicol dioctanoico, ácido etilenglicol dioleico, ácido propilenglicol dicáprico, (ácido cáprico, capril) propilenglicol, ácido propilenglicol dicaprílico, ácido neopentilglicol dicáprico, ácido neopentilglicol dioctanoico, ácido gliceril tricaprílico, ácido gliceril triundecídico, ácido gliceril triisopalmítico, ácido gliceril triisosteárico, ácido octildodecil neopentanoico, ácido isoestearil octanoico, ácido octil isononanoico, ácido hexildecil neodecanoico, ácido octildoceilneodecanoico, ácido isocetil isoesteárico, ácido isoestearil isoesteárico, ácido octildecil isoesteárico, éster poliglicerina oleanoico, ácido ester poliglicerina ácido isoesteárico, ácido triisocetil cítrico, ácido triisovalquil cítrico, ácido triisooctil cítrico, ácido lauril láctico, ácido miristil láctico, ácido cetil láctico, ácido octildecil láctico, ácido trietil cítrico, ácido acetiltriethyl cítrico, ácido acetil tributil cítrico, ácido triocetil cítrico, ácido diisosteárico maleico, ácido di 2-etilhexilhidroxiesteárico, ácido 2-etil hexil succínico, ácido diisobutil adípico, ácido diisopropil sebacínico, ácido dioctil sebacínico, ácido colesteril esteárico, ácido colesteril isoesteárico, ácido colesteril hidroxisteárico, ácido colesteril oleico, ácido dihidrocolesteril oleico, ácido pitsteril isoesteárico, ácido pitsteril oleico, ácido isocetil 12-estealoil hidroxisteárico, ácido estearil 12-estealoil hidroxi esteárico, ácido isoestearil 12-estealoil hidroxi esteárico.

35 Los aceites de hidrocarburos preferidos que se describen anteriormente pueden incluir escualeno, parafina líquida, oligómeros  $\alpha$ -olefínicos, isoparafinas, cerasina, parafinas, isoparafinas líquidas, polibudenos, cera microcristalina, vaselina y similares.

40 Los aceites de silicona preferibles pueden incluir polimetilsilicona, metilfenilsilicona, metilciclopolisiloxano, octametilpolisiloxano, decametilpolisiloxano, dodecametilciclosiloxano, copolímero de dimetil siloxano-metil cetiloxisiloxano, copolímero de dimetil siloxano-metil stealoxisiloxano, aceite de silicona alquil modificado, aceite de silicona amino modificado y similares.

45 Los aceites fluoruro preferibles pueden incluir perfluoropoliéteres y similares.

50 Los aceites animales o vegetales preferidos pueden incluir aceite de aguacate, aceite de almendras, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de cáscara de arroz, aceite de cártamo, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de colza, aceite de amigdalina, aceite de semilla de palma, aceite de palma, aceite de ricino, aceite de girasol, aceite de semillas de frutas, aceite de semillas de algodón, aceite de palmas de coco y aceite de coco, aceite de brotes de embrión de trigo, aceite de brotes de embrión de arroz, manteca de karité, aceite de onagra, aceite de macadamia, aceite casero, aceite de yema de huevo, lanolina, aceite de cáñamo, aceite de visón, aceite de naranja ruppy, aceite de jojoba, cera de carnauba, lanolina líquida, cera sólida de ricino, y similares.

55 Los humectantes preferidos pueden incluir humectantes solubles en agua de bajo peso molecular, humectantes lipofílicos de bajo peso molecular, polímeros solubles en agua y polímeros solubles en lípidos.

60 Específicamente, los humectantes preferibles solubles en agua de bajo peso molecular, pueden incluir cerina, glutamina, sorbitol, manitol, pirrolidona, ácido sódico carboxílico, glicerina, propilenglicol, 1-3-butilenglicol, etilenglicol, polietilenglicol (índice de polimerización >2), polipropilenglicol (índice de polimerización >2), ácido láctico, sal lactato y similares.

Los humectantes solubles en lípidos y de bajo peso molecular, pueden incluir colesterol, éster colestérico y similares.

65 Los polímeros preferibles hidrosolubles pueden incluir polímeros carboxivinílicos, sales de ácido poliasparagínico,



tragacanto, goma de xantina, HMC (hidroximetil celulosa), HEC (hidroxietil celulosa), HPC (hidroxipropil celulosa), carboximetilcelulosa, quitina hidrosoluble, quitosán, dextrina y similares.

5 Los polímeros preferidos solubles en lípidos pueden incluir copolímero polivinilpirrolidona-eicoceno, copolímero polivinil pirrolidona-hexadeceno, nitrocelulosa, éster de dextrina y ácidos grasos, polímero de silicona y similares.

Los emolientes preferibles pueden incluir ésteres colestéricos de ácido acil glutámico de larga cadena, ácidos colestiril hidroxil esteáricos, ácidos 12-hidroxi esteáricos, ácido rógico, ésteres colestéricos de ácidos grasos de lanolina y similares.

10 Los agentes activos superficiales preferibles pueden incluir surfactantes no iónicos, surfactantes aniónicos, surfactantes catiónicos, surfactantes anfivalentes y similares.

15 Específicamente los surfactantes no iónicos preferidos pueden incluir glicerina ácido monoesteárico autoemulsificada, ésteres de ácidos grasos y propilenglicol, ésteres de ácidos grasos y glicerina, ésteres de ácidos grasos y poliglicerina, ésteres de ácidos grasos y sorbitano, ésteres de ácidos grasos y polioxietilén sorbitano (POE), ésteres de ácidos grasos y POE sorbitano, ésteres de ácidos grasos y POE glicerina, éster POE alquílico, ésteres de ácidos grasos y polioxietilén sorbitano (POE), aceite polioxietilén sorbitano (POE) sólido de ricino, aceite POE de ricino copolímero POE-POP, éter POE-POP alquílico silicona modificada por poliéter, amida alcohol ácido láurico, óxido alquil amina, fosfolípido de adición de hidrógeno de la soja, y similares.

20 Los surfactantes aniónicos preferidos pueden incluir jabón de ácidos grasos, sales de ácidos  $\alpha$ -acil sulfónicos sales de ácidos alquil sulfónicos, ácidos alquil alil sulfónicos, sales de ácidos alquil naftaleno sulfónicos, sales de ácidos alquil sulfónicos, sales POE alquiléter sulfato, sales alquilamida sulfato, sales alquil fosfato, sales POE alquil fosfato, sales alquilamida fosfato, sales alquiloilalquil taurina, sal del ácido N-acil-amino, sales POE alquil éter del ácido carboxílico, sales del ácido alquil sulfo succínico, sales del ácido alquil sulfo-acético, sal peptídica del colágeno hidrolizable, éster perfluoro alquil fosfato y similares.

30 Los surfactantes catiónicos preferidos pueden incluir cloruro alquil trimetil amónico, cloruro estearil trimetil amónico, bromuro estearil trimetil amónico, cloruro setoesteariltrimetil amónico, cloruro diestearil dimetilamónico, cloruro estearil dimetil bencil amónico, bromuro veheniltrimetil amónico, cloruro de benzalconio, ácido dietil amino etil amida esteárico, ácido dimetil aminopropil amida esteárico, derivados amónicos cuaternarios de lanolina o similares.

35 Los surfactantes ambivalentes preferidos pueden incluir los de tipo carboxibetaina, de tipo amido betaina, de tipo hidroxil sulfato betaina, de tipo fosfobetaína, ácido aminocarboxílico, de tipo derivados de la imidazolina, de tipo amida amina y similares.

40 Los colorantes preferidos orgánicos e inorgánicos pueden incluir ácido silícico, ácido silícico anhidro, ácido silícico magnésico, talco, ceracita, mica, caolín, bengala, arcilla, bentonita, mica de recubrimiento de titanio, oxicluro bismuto, óxido de circonio, óxido magnésico, óxido de cinc, óxido de titanio, óxido de aluminio, sulfato cálcico, sulfato bórico, sulfato magnésico, carbonato cálcico, carbonato magnésico, óxido ferroso, óxido crómico, hidróxido crómico, calamina, carbono negro y su combinación como colorantes inorgánicos; poliamida, poliéster, polipropileno, poliestireno, poliuretano, resina vinílica, resina ureica, resina fenólica, resina fluorídica, resina de silicona, resina acrílica, resina de melamina, resina epoxi, resina policarbonato, copolímero estireno-divinil benceno, polvo de seda, celulosa, pigmento CI amarillo, pigmento CI naranja como colorantes orgánicos; y sus complejos, etc.

45 Los polvos orgánicos preferibles pueden incluir jabones metálicos tales como estearato cálcico; sales alquil fosfonato metálicas tales como ácido cetílico sódico de cinc, ácido laurílico de cinc, ácido laurílico de calcio; metales acilamina ácido polivalentes, tales como calcio N-lauroil- $\beta$ -alanina, zinc N-lauroil- $\beta$ -alanina, calcio N-lauroil-glicina, etc.; sales metálicas aminoácido sulfónicas polivalentes tales como calcio N-lauroil- $\beta$ -alanina, calcio N-lauroil- $\beta$ -alanina, calcio N-palmitoil- $\beta$ -alanina, aminoácidos N-acil básicos tales como N $\epsilon$ -lauroil-L-lisina- N $\epsilon$ -palmitoil-lisina, N $\alpha$ -palmitoil ornitina, N $\alpha$ -lauroil arginina, acil arginina de ácidos grasos de lanolina endurecida y similares; N-acilpolipéptidos tales como N-lauroilglicina;  $\alpha$ -aminoácidos grasos tales como el  $\alpha$ -amino caprílico, el  $\alpha$ -amino láurico y similares; polietileno, propileno, nailon, polimetilmetacrilato, poliestireno, copolímero divinilbenceno-estireno, tetrafluoruro de etileno y así sucesivamente.

55 Los agentes que absorben los rayos ultravioleta preferidos pueden incluir el ácido paraaminobenzoico, paraamonoltil benzoato, paraamino amil benzoato, paraamino octil benzoato, etilenglicol salicilato, fenil salicilato, octil salicilato, bencil salicilato, butifenil salicilato, homomentil salicilato, ácido bencil cinnámico, ácido parametoxi 2-etoxi etil cinnámico, ácido parametoxi octil cinnámico, ácido diparametoxi mono-2-etil hexano gliceril cinnámico, ácido parametoxi isopropil cinnámico, mezcla estérica de diisopropil-diisopropil cinnamato, ácido urocánico, ácido etil urocánico, hidroxil metoxi benzofenona, ácido hidroximetoxi benzofenona sulfónico y su sal, dihidroxil metoxi benzofenona, disulfonato sódico dihidroxil metoxi benzofenona, dihidroxil benzofenona, tetrahidroxil benzofenona, 4-tert-butil-4'-metoxidibenzoilmetano, 2,4,6-trianilino-p-(carbo-2'-etilhexil-1'-oxi)-1,3,5-triazina, 2-(2-hidroxi-5-metilfenil)benzotiazol, y similares.

65 Los conservantes preferibles pueden incluir hinoquitiol, ácido tricloro, éter triclorohidroxidifenílico, glucuronato de clorohexidrina, fenoxietanol, resorcina, isopropilmetilfenol, azuleno, ácido salicílico, cinc pilitona, cloruro de

benzalconio, fotosensibilizador 301, mononitroguayacol sódico, ácido undecilénico, etc.

Los antioxidantes preferibles pueden incluir butilhidroxianisol, propil galato, elisorbato y similares.

5 Los controladores preferibles del pH pueden incluir ácido cítrico, citrato sódico, ácido málico, malato sódico, ácido fumárico, ácido fumárico sódico, ácido succínico, ácido succínico sódico, hidróxido sódico, fosfato hidrógeno sódico y similares.

Los alcoholes preferibles pueden incluir alcohol cetílico, etc.

10 Además, otros ingredientes que pueden añadirse a los componentes anteriormente descritos, y la cantidad en que se encuentran, no están limitados dentro del alcance del efecto y objetivo de la presente invención, siendo preferible, sin embargo, que la cantidad de los demás ingredientes sea del orden de entre el 0,01 y 5%, y más preferentemente, de entre el 0,01 y el 3% de la composición total.

15 La composición cosmética puede modificarse como una solución, emulsión, mezcla cohesiva, etc.

Los ingredientes anteriormente descritos tales como vitaminas hidrosolubles, vitaminas solubles en lípidos, polímeros peptídicos, polímeros polisacáridos, esfingolípidos, extracto de algas e ingredientes que pueden añadirse además de los anteriormente descritos, si es necesario, pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales que se dan a conocer en la literatura (Matsumoto Mithio, *Manual for the development of transdermal applied preparation*. Seisi Press, 1ª Ed., 1985.

20 Además, la presente invención describe también aditivos cosméticos que incluyen los extractos anteriores como el componente esencial para la prevención o mejora de enfermedades alérgicas y no alérgicas.

Los aditivos cosméticos mencionados pueden utilizarse añadiéndolos a los cosméticos existentes y a la solución de lavado, para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades alérgicas y las enfermedades dérmicas no alérgicas.

30 Además los aditivos cosméticos anteriores pueden utilizarse en cremas, lociones, equipos para masajes, y soluciones de lavado corporal, jabones, champús y similares.

El extracto de la invención no presenta toxicidad ni efectos secundarios; puede utilizarse de forma segura.

35 Está claro para los expertos en la materia que en las composiciones pueden llevarse a cabo diversas modificaciones, variaciones, utilización y preparaciones de esta invención, sin apartarse del espíritu o alcance de la invención.

40 La presente invención se explica con mayor detalle mediante los ejemplos siguientes. Sin embargo, debe apreciarse que la presente invención no se limita, en modo alguno, a estos ejemplos.

#### **Breve descripción de las Figuras**

45 Los objetivos anteriores y otros, las características y otras ventajas de la presente invención, se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente, haciendo referencia a las figuras adjuntas, en las que;

La figura 1a muestra una fotografía TLC de los extractos y fracciones del fruto endurecido del kiwi;

50 La figura 1b muestra la fotografía 2D-TLC de la [1] subfracción;

La figura 1c muestra la fotografía 2D-TLC de la subfracción [2];

55 La figura 2a presenta los resultados con respecto de los síntomas de rascado dérmico, que se investigaron a las 12 semanas después de la administración del extracto endurecido del fruto del kiwi en los ratones Nc/Nga con dermatitis atópica;

60 La figura 2b presenta resultados con relación a los síntomas del rascado dérmico, que se investigó a las 14 semanas después de la administración del extracto del fruto endurecido del kiwi, en los ratones Nc/Nga con dermatitis atópica;

#### **Mejor modo de poner en práctica la invención**

Los siguientes Ejemplos y Ejemplos Experimentales tienen la intención de ilustrar más la presente invención sin limitar su alcance.

65

**Ejemplo 1. Preparación del extracto del fruto endurecido del kiwi****1-1. Preparación del extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi**

5 Se fragmentaron 100 g del fruto endurecido del kiwi y del tallo seco del fruto endurecido del kiwi (*Actinidia arguta*), del fruto seco de *A. kolomikta* y del *A. polygama*, obtenidos del Mercado Kyung-dong localizado en Seúl, se mezclaron con 1 litro de agua destilada y se sometieron a extracción por reflujo durante 3 horas, a 90 ~ 95°C, tres veces, filtrándose el extracto con papel de filtro, y se concentró utilizando un evaporador rotatorio (N-1000, Eyela Co. Japón) a 55 ~ 65°C bajo presión reducida, secándose con un secador congelador para obtener 15,6 g del extracto del fruto seco, 10,4 g del extracto del tallo seco del fruto del kiwi (*Actinidia arguta*), 16,2 g y 17,0 g del extracto del fruto seco de *A. kolomikta* y de *A. polygama*, respectivamente. El polvo seco se disolvió en agua destilada (100 mg/ml).

**1-2. Preparación del extracto soluble hidro-alcohólico del fruto endurecido del kiwi**

15 Excepto la utilización de diversas proporciones de mezcla de disolvente hidroalcohólico como el 30%, 50% y 70% de disolvente etanólico como disolvente extractor, todos los procedimientos fueron idénticos a los del Ejemplo 1-1. Como resultado, 11 ~ 13 g del polvo seco del endurecido fruto del kiwi se obtuvieron en cada proporción de la mezcla del disolvente, disolviéndose el polvo seco en agua destilada (100 mg/ml).

**Ejemplo 2. Preparación del extracto del fruto endurecido del kiwi soluble en el disolvente no polar y en el polar**

25 El extracto acuoso preparado en el Ejemplo 1-1 se fraccionó mediante el procedimiento siguiente.

**2-1. Preparación de la fracción soluble en cloroformo**

30 Se añadieron 50 ml de agua destilada a 5 g del extracto del fruto endurecido de kiwi obtenido en el Ejemplo 1-1. Se añadieron entonces 50 ml de cloroformo en un embudo de separación, agitándose vigorosamente para dividirlo en una capa soluble en cloroformo y en otra capa soluble en agua.

**2-2. Preparación de la fracción soluble en acetato de etilo**

35 La capa anterior soluble en cloroformo obtenida en el Ejemplo 1-1, se mezcló con 50 ml de acetato de etilo, dividiéndose entonces en la capa soluble en acetato de etilo y en la capa soluble en agua.

40 La capa anterior soluble en cloroformo, la capa soluble en acetato de etilo y la capa acuosa se concentraron mediante un evaporador rotatorio, y se secaron mediante un liofilizador para obtener 0,34 g de la fracción soluble en cloroformo, 0,05 g de la fracción soluble en acetato de etilo y 4,61 g de la fracción pulverulenta hidrosoluble, respectivamente.

**Ejemplo 3. Fraccionamiento del extracto del fruto endurecido del kiwi mediante cromatografía en columna de gel de sílice**

45 Se sometieron 2,784 mg de la fracción soluble en acetato de etilo en el Ejemplo 2-2, posteriormente a cromatografía en columna de gel de sílice (Daiso gel IR-60-W-40:63 mm). El disolvente de revelado empezó con la mezcla de disolventes cloroformo: metanol: agua ([1] 90: 11: 1, [2] 60: 10: 1, [3] 60: 20: 2) y terminó con metanol [4], con una velocidad de elusión de 300 ml/hr, para obtener las sub-fracciones [1] 2,381 mg, [2] 135 mg, [3] 148 mg, [4] 98 mg).

50 El extracto acuoso anterior, la fracción soluble de acetato de etilo y las cuatro subfracciones, se sometieron a TLC (TLC plate: Merck Co. Ltd., disolvente de revelado; cloroformo: metanol: agua = 9: 5: 1), mostrándose los resultados en la figura 1a. Tal como se muestra en la figura 1a, el carril 1 es extracto acuoso, el carril 2 es la fracción soluble de acetato de etilo, el carril 3 es la subfracción [4], el carril 4 es la subfracción [3], el carril 5 es la subfracción [2] y el carril 6 es la subfracción [1].

55 Las subfracciones anteriores [1] y [2] se sometieron a 2D-TLC utilizando la mezcla disolvente cloroformo: metanol: agua (9: 5: 1) como primer revelado y la mezcla disolvente cloroformo: acetona: agua (3: 8: 0,5) como 2º revelado (véase la figura 1b y la figura 1c).

**Ejemplo Experimental 1: Inhibición de la producción de IgE por la progenie celular U266B1, mediante el extracto endurecido del fruto del kiwi****1-1. Efecto del extracto del fruto endurecido del kiwi sobre la producción de IgE**

65 Para confirmar el efecto inhibitorio del extracto endurecido del fruto del kiwi en la producción de IgE, se utilizaron las células U266B1 (progenie celular del linfoblastoma). La U266B1 es la progenie celular de las células B humanas,

que producen IgE

Las células U266B1 (American Type Culture Collection, Manassas, VA), se cultivaron a 37°C bajo CO<sub>2</sub> al 5% en placas de cultivo de 24 pocillos que contenían medio RPMI-1640 (FBS al 15% 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES, 1 mM pirurato sódico, 50 µg de estreptomina y 100 U/ml de penicilina). Las células se ajustaron a la concentración de 2 x 10<sup>5</sup> células/pocillo y se trataron con LPS (2 µg/ml) y 100 µg/ml de extracto endurecido del fruto del kiwi preparado en el Ejemplo 1-1 y 1-2. El control se trató con 2 µM de dexametasona o medio (RPMI-1640). Después del tratamiento, se cultivaron las células durante 7 días, midiéndose la concentración de IgE del medio, mediante el equipo ELISA (PharMingen; San Diego, CA).

Tal como se muestra en la Tabla 1, todos los extractos acuosos del fruto endurecido del kiwi, *A. kolomikta* y *A. polygama* mostraron el efecto inhibitorio sobre la producción de IgE tanto como la dexametasona (control). Asimismo, el extracto etanólico al 70% del fruto endurecido del kiwi, mostró la actividad más intensa entre los tres tipos del extracto alcohólico del fruto endurecido del kiwi de la invención. El extracto del tallo del fruto endurecido del kiwi, mostró un efecto similar a los extractos anteriormente mencionados del fruto endurecido del kiwi.

**TABLA 1**

Estimulación con LPS	Tratamiento	IgE (IU/ml)
-	Medio	187,8 ± 8,4
+	Medio	392,9 ± 3,4
+	Extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi	228,8 ± 7,1
+	<i>Actinidia kolomikta</i> extracto acuoso	233,2 ± 5,8
+	<i>Actinidia polígama</i> extracto acuoso	211,7 ± 7,9
+	Extracto del tallo del fruto endurecido del kiwi	241,5 ± 5,8
+	Extracto etanólico al 30% del fruto endurecido del kiwi	306,2 ± 16,5
+	Extracto etanólico al 50% del fruto endurecido del kiwi	266,8 ± 17,0
+	Extracto etanólico al 70% del fruto endurecido del kiwi	201,9 ± 27,6
+	Dexametasona	203,6 ± 30,9

### 1-2. Efecto de la fracción soluble de acetato de etilo del fruto endurecido del kiwi en la producción de IgE

Para comparar el efecto inhibitorio en la producción de IgE de las células U266B1, la fracción soluble de cloroformo, la fracción soluble de acetato de etilo y la fracción hidrosoluble que se prepararon en el Ejemplo 2 anterior, se sometieron al experimento idéntico que se da a conocer en el Ejemplo Experimental 1-1.

La línea celular U266B1 se trató con la fracción soluble en cloroformo, la fracción soluble en acetato y la fracción hidrosoluble a razón de 30 µg/ml.

Tal como se muestra en la Tabla 2, la fracción soluble en acetato de etilo mostró un efecto inhibitorio más intenso sobre la producción de IgE que la de la dexametasona (control).

**TABLA 2**

Estimulación con LPS	Tratamiento	IgE (IU/ml)
-	Medio	117,4 ± 7,6
+	Medio	212,5 ± 11,8
+	Extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi	151,7 ± 11,9
+	Fracción clorofórmica	206,7 ± 15,6
+	Fracción de acetato de etilo	123,3 ± 8,1
+	Fracción acuosa	218,9 ± 13,3
+	Dexametasona	138,9 ± 2,1

### 1-3. Efecto de la fracción cromatográfica de la columna de gel de sílice, sobre la producción de IgE

Las fracciones cromatográficas en columna de gel de sílice [1], [2], [3] y [4] preparadas en el Ejemplo 3, se sometieron al experimento idéntico dado a conocer en el Ejemplo Experimental 1-1, para comparar el efecto inhibitorio de la producción de IgE sobre las células U266B1.

Las fracciones cromatográficas de la columna de gel de sílice [1], [2], [3] y [4] se aplicaron a la progenie celular U266B1 (a 10 µg/ml).

Como el resultado de la Tabla 3, las fracciones [1], [2] cromatográficas de la columna de gel de sílice, mostraron la actividad inhibitoria sobre la producción de IgE.

TABLA 3

Estimulación con LPS	Tratamiento	IgE (IU/ml)
-	Medio	379,7 ± 13,2
+	Medio	540,4 ± 35,1
+	Fracción de acetato de etilo	298,1 ± 9,7
+	Fracción 1 de gel de sílice	293,5 ± 12,5
+	Fracción 2 de gel de sílice	307,6 ± 24,1
+	Fracción 3 de gel de sílice	453,1 ± 17,3
+	Fracción 4 de gel de sílice	396,9 ± 26,8
+	Dexametasona	277,6 ± 12,4

### Ejemplo Experimental 2. Efecto antialérgico del extracto endurecido del fruto del kiwi en un modelo de ratón sensibilizado a la ovoalbúmina

#### 2-1. Preparación del modelo murino sensibilizado a la ovoalbúmina

El modelo murino sensibilizado a la ovoalbúmina se utiliza habitualmente como modelo animal de alergia. Ratonas hembras BALB/c, de 6 semanas de edad (Centro experimental animal de la Universidad Nacional de Seúl), se adaptaron al medio ambiente durante siete días. En todas las 7 semanas después del nacimiento, se inyectó en la cavidad peritoneal de los animales 100 µl de emulsión, mezclada con 25 µg de ovoalbúmina (albúmina de huevos de gallina, de grado V en bruto, Sigma Co., Ltd., con 2,25 mg de hidróxido de aluminio, (ImjectAlum, Pierce Co., Ltd.) y 14 días después, se inyectó otra vez para recuerdo.

Y, entonces, 30 ratones se dividieron en 3 grupos, administrándose oralmente cada grupo con el extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi del Ejemplo 1-1 (300 µg/ratón/día), dexametasona (10 µg/ratón/día) o agua para beber (100 µg/ratón/día) durante 11 días, respectivamente. En el día 25, se sacrificaron los animales, recuperándose de ellos el suero sanguíneo y el bazo.

#### 2-2. Análisis de la concentración en el suero de las IgE; IgG1, IgG2a, IgG2b específicas para la ovoalbúmina

En el suero recuperado en el Ejemplo 2-1, se midieron mediante los equipos ELISA los niveles séricos de IgE, IgG1, IgG2a y IgG2b específicos de la ovoalbúmina (PharMingen Co., Ltd.).

La Tabla 4 muestra la concentración relativa de cada anticuerpo del ratón sensibilizado a la ovoalbúmina, con respecto a la del animal normal. En el ratón al que se administró el extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi, el nivel ovoalbérmico-específico de IgE disminuyó por debajo de 1/3 y el nivel de IgG1 descendió significativamente. El nivel de IgE e IgG1 descendió de forma significativa en ratones a los que se administró dexametasona.

El nivel de IgG2a asociado con la inmunidad celular, aumentó por encima de 2 veces en los ratones a los que se administró el extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi, pero no aumentó en los animales a los que administró la dexametasona.

Mostró que el extracto del fruto endurecido del kiwi pudo mejorar la constitución alérgica fundamental disminuyendo la IgE, que induce los síntomas alérgicos, y aumentando IgG2a relacionada simultáneamente con la inmunidad normal. También aclaró que el fruto endurecido del kiwi puede aumentar la eficiencia del tratamiento cuando se utiliza con inmunoterapia como un asistente de la inmunoterapia de la alergia, ya que la reducción de la IgE alérgico específica y el aumento del IgG2a alérgico específico tienen su objetivo principal en el campo inmunoterapéutico.

TABLA 4

	Normal	Agua bebible	Extracto del fruto endurecido del kiwi	Dexametasona
IgE	1,0 ± 0,0	7,6 ± 0,2	2,2 ± 0,5	2,0 ± 0,6
IgG1	1,0 ± 0,0	5,1 ± 0,1	3,3 ± 0,3	3,1 ± 0,3
IgG2a	1,0 ± 0,1	2,1 ± 0,4	4,6 ± 0,3	1,9 ± 0,4
IgG2b	1,0 ± 0,0	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Unidad: pg/ml				

#### 2-3. Análisis de la expresión de las citocinas por los esplenocitos

Para analizar la expresión de las citocinas por los esplenocitos de ratones a los que se había administrado el extracto del fruto endurecido del kiwi, se prepararon esplenocitos a partir del bazo preparado en el Ejemplo 2-1, de la siguiente forma.

Los esplenocitos preparados se agruparon y homogeneizaron bajo condiciones asépticas.

Los esplenocitos se lavaron con medio RPMI-1640, filtrándose a través de una red de nailon (60  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro), para eliminar grandes coágulos, y se centrifugaron (1.500 rpm, 5 minutos), para separar las células precipitadas, añadiéndose éstas entonces al medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%.

Los esplenocitos así preparados, se inocularon en placas de 24 pocillos ( $5 \times 10^6$  células/ml/pocillo), se trataron con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ovoalbúmina, y se inocularon a 37°C bajo atmósfera que contenía  $\text{CO}_2$  al 5% durante 3 días. Acabado el cultivo, se recogió una solución de éste, midiéndose entonces la concentración de citocinas (IL-4, IL-5, IL-12 y de interferón- $\gamma$ ) relacionados con la alergia, mediante equipos comerciales de ELISA.

Tal como se muestra en la Tabla 5, los esplenocitos murinos a los que se administró el extracto del fruto endurecido del kiwi, tenían disminuido el nivel de IL4 y de IL-5 disminuido (que propicia las citocinas Th2 que inducen la alergia), y el nivel de IL-12 y de interferón- $\gamma$  aumentado (que propicia las citocinas Th1 que inhiben la alergia). En el caso de los ratones tratados con dexametasona, tanto las citocinas Th1 como las Th2 disminuyeron.

**TABLA 5**

	Ratones normales	Ratones estimulados por OVA		
		Agua bebible	Extracto del fruto endurecido del kiwi	Dexametasona
IL-4	21,6 $\pm$ 11,8	159,5 $\pm$ 15,7	76,5 $\pm$ 10,0	23,2 $\pm$ 8,7
IL-5	0,5 $\pm$ 0,8	2573,6 $\pm$ 42,0	1638,3 $\pm$ 33,3	884,1 $\pm$ 80,7
IL-12	1626,0 $\pm$ 58,5	906,2 $\pm$ 66,0	1321m2 $\pm$ 92,4	297,7 $\pm$ 16,4
Interferón- $\gamma$	14,1 $\pm$ 19,6	1016,0 $\pm$ 25,6	1688,2 $\pm$ 15,8	470,5 $\pm$ 38,6
				Unidad: pg/ml

Se confirmó que el extracto del fruto endurecido del kiwi puede prevenir y mejorar las enfermedades alérgicas, aumentando las citocinas Th1, así como disminuyendo específicamente las citocinas Th2, mientras que la dexametasona inhibe al sistema inmunológico en su totalidad.

### Ejemplo Experimental 3. Regulación por disminución de las citocinas Th1/Th2 en las células PBMC

Se prepararon células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMCs) con Ficoll hypaque a partir de sangre entera de un paciente alérgico que presentaba un nivel sérico basal alto de IgE y se cultivaron en medio RPMI con FBS al 10%. Las PBMC se trataron conjuntamente con el extracto del fruto endurecido del kiwi (con 100  $\mu\text{g/ml}$ ) y fitohemaglutinina (PHA, con 5  $\mu\text{g/ml}$ ), una lectina que se utiliza habitualmente con un efecto inmune estimulante, cultivándose las PBMC con  $\text{CO}_2$  al 5% y a 37°C; 48 horas después se midió, utilizando ELISA, el nivel de IL-5, IL-13, IL-10 y del interferón- $\gamma$  en el sobrenadante del cultivo.

La Tabla 6 muestra que el extracto del fruto endurecido del kiwi redujo significativamente el nivel sérico de las citocinas Th2: los niveles séricos de IL-5 e IL-13 se redujeron en un 52% y 47%, respectivamente, mientras que el nivel sérico del interferón- $\gamma$ , una citocina Th1, aumentó en 3,2 veces. Este resultado sugiere que el extracto del fruto endurecido del kiwi podría aumentar el nivel de las citocinas Th1, disminuyendo simultáneamente el nivel de las citocinas Th2. Se ha informado previamente que la regulación por disminución de las citocinas Th2 podría contribuir al aligeramiento de la síntesis de IgE y de la inflamación alérgica.

**TABLA 6**

PHA estimulación	Tratamiento	IL-5	IL-13	IL-10	Interferon- $\gamma$
-	-	92,2 $\pm$ 6,4	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	53,3 $\pm$ 30,2
+	Medio	518,1 $\pm$ 120,3	667,8 $\pm$ 46,5	480,3 $\pm$ 15,3	334,1 $\pm$ 277,7
+	Extracto endurecido del fruto del kiwi	248,5 $\pm$ 62,0	355,7 $\pm$ 93,1	570,2 $\pm$ 56,3	1067 $\pm$ 345,1
					Unidad: pg/ml

### Ejemplo Experimental 4. Reducción del nivel sérico humano de IgE

Para ensayar si el extracto del fruto endurecido del kiwi reduce o no el nivel sérico de IgE en el hombre, se administró oralmente a dos pacientes alérgicos (pacientes K y B con rinitis alérgica y dermatitis alérgica, respectivamente, que mostraban altos niveles séricos basales de IgE, un extracto de los frutos endurecidos del kiwi (1 g en peso seco), a una dosis diaria, en un período de tiempo de 21 días, midiéndose cada dos semanas, mediante ELISA, sus niveles séricos de IgE.

El resultado del experimento mostró que los niveles séricos de IgE en los dos pacientes se redujeron continuamente en 2/3 después de 42 días, mejorándose también los síntomas de la dermatitis del paciente E durante el período de experimentación (véase Tabla 7).

5 **TABLA 7**

	1 día	14 días	28 días	42 días
Paciente K	950,8 IU/ml	855,6 IU/ml	679,1 IU/ml	266,1 IU/ml
Paciente E	278,3 IU/ml	236,0 IU/ml	189,2 IU/ml	95,0 IU/ml

**Ejemplo Experimental 5. Inhibición de la liberación de histamina a partir de las células cebadas peritoneales de ratones**

10 La liberación de histamina a partir de las células cebadas constituye una de las causas más importantes de las reacciones alérgicas. Por tanto, se ensayaron los efectos del extracto del fruto endurecido del kiwi sobre la liberación de histamina a partir de las células cebadas.

15 Se anestesió con éter a cada ratón, y se le inyectaron 20 ml del tampón Tyrode B (NaCl, glucosa, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) que contenía gelatina al 0,1%, en la cavidad peritoneal, masajeándose suavemente entonces el abdomen durante 90 segundos aproximadamente. Se abrió cuidadosamente la cavidad peritoneal, aspirándose mediante pipetas Pasteur el líquido que contenía las células peritoneales. Las células peritoneales se sedimentaron entonces a 150 x g durante 10 minutos, a temperatura ambiente, y se volvieron a suspender en tampón Tyrode B. Las células cebadas se separaron de los componentes principales de las células peritoneales de las ratas, tal como se describe en la literatura (Yurt et al., J Esp Med., 1:146(5), pp 1.405-19, 1977). Las células peritoneales suspendidas en 1 ml del tampón Tyrode B, se distribuyeron en capas sobre 2 ml de 0,225 g/ml de metrizamida (densidad, 1,120 g/ml) y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 15 minutos a 400 x g. las células que permanecían en la interfase tampón-metrizamida, se aspiraron y descartaron; las células del sedimento se lavaron y se volvieron a suspender en 25 1 ml de tampón Tyrode A que contenía calcio. Los esplenocitos se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (2 x 10<sup>5</sup> células/pocillo) en 0,4 ml de medio para cada pocillo. Las células se incubaron por la noche a 37°C y se sensibilizaron con 0,5 µg/ml de anti-DNP<sub>24</sub>-BSA IgE. Después de sensibilizar las células con IgE, se eliminó el medio, lavándose las células dos veces con 0,5 ml de tampón PIPES, y preincubándose con 200 µl de tampón PIPES (como control), Cromolyn (10<sup>-4</sup> M) o extracto del fruto endurecido del kiwi (100 µg/ml) a 37°C durante 10 minutos. Las células cebadas se estimularon con 20 ng/ml de DNP<sub>24</sub>-BSA como un antígeno durante 30 minutos, midiéndose mediante ELISA (ALerCHEK), la histamina liberada al medio. La inhibición de la liberación de histamina se calculó según la fórmula empírica 1;

**[Fórmula Empírica]**

35 Porcentaje de inhibición  $100 \times (A-B)/(A-C)$

A: Nivel estimulado (liberación de histamina con estimulación de IgE).

40 B: Nivel de inhibición (liberación de histamina con estimulación IgE y tratamiento farmacológico).

C: Nivel basal (liberación de histamina sin estimulación de IgE).

45 La tabla 8 indica que el extracto de fruto endurecido del kiwi inhibió la liberación de histamina en un 44% aproximadamente a 100 µg/ml, y fue tan efectivo como el Cromolyn utilizado como control positivo.

**TABLA 8**

Tratamiento	Cromolyn	Fruto endurecido del kiwi
Inhibición (%)	52 ± 13	44 ± 10

50 **Ejemplo Experimental 6. Efectos antiinflamatorios sobre el edema inducido por el ácido araquidónico en las orejas de los ratones**

55 Se sometieron 15 ratones (BALB/c de 8 semanas de edad) a ayuno durante 18 horas, con acceso libre al agua, y se dividieron en 3 grupos. La inflamación se indujo por aplicación tópica del ácido araquidónico (0,5 mg/20 µl de acetona) en la oreja derecha de cada animal. La oreja izquierda se utilizó como un control negativo y recibió el vehículo (20 µl de acetona). El extracto del fruto endurecido del kiwi (200 mg/kg en agua) se administró vía oral 1 hora antes de la aplicación del ácido araquidónico. El grupo control positivo recibió indometacina (10 mg/kg vía oral) 1 hora antes de la aplicación del ácido araquidónico. La inflamación siguió durante una hora, y entonces los animales se sacrificaron. Se obtuvo un corte de 6 mm de diámetro de cada oreja, y se pesó. Se evaluó el índice edemático utilizando el aumento en el peso de la biopsia de la oreja derecha tratada, con respecto al de la oreja

60

izquierda o tratada. El índice edemático de los ratones de control que no recibieron ningún tratamiento, fue de  $7,2 \pm 1,1$  mg. Sin embargo, cuando los animales se trataron con el extracto del fruto endurecido del kiwi, el índice disminuyó en 62,5% a  $2,7 \pm 0,8$  mg. La oreja tratada con indometacina como un control positivo, mostró una disminución del 81,9% en el índice edemático, comparado con la oreja no tratada (Véase Tabla 9).

Estos datos sugieren que los frutos endurecidos del kiwi, mostraban una actividad antiinflamatoria comparable con la indametacina en este modelo experimental.

**TABLA 9**

Tratamiento	Índice edemático	Proporción de inhibición (%)
Control	$7,2 \pm 1,1$	-
Extracto del fruto endurecido del kiwi	$2,7 \pm 0,8$	62,5
Indametacina	$1,3 \pm 0,3$	81,9

**Ejemplo Experimental 7. Experimento del modelo murino con la dermatitis alérgica**

Para confirmar el efecto antialérgico del extracto del fruto endurecido del kiwi en los animales, se utilizó un modelo murino Nc/Nga que se ha utilizado ampliamente como un modelo animal para el estudio de la dermatitis atópica humana. El ratón Nc/Nga muestra una inmunidad Th1 suprimida a causa de su carácter genético, es decir, un bajo nivel de producción de interferón- $\gamma$  y, consecuentemente, la inmunidad Th2 resulta preponderante, lo que predispone al ratón Nc/Nga a la enfermedad alérgica preponderantemente a la dermatitis atópica bajo circunstancias normales (Vestergaard CH et al., J. Clin. Invest., 104, pp 1.097-1.105, 1999).

Para el experimento, 15 de los ratones Nc/Nga (hembras, 7 semanas después del nacimiento), se dividieron en 3 grupos y se adaptaron a las nuevas circunstancias durante 1 semana. Desde 8 semanas después del nacimiento, el extracto del fruto endurecido del kiwi (300  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ ) preparado en el ejemplo 1-1 como un tratamiento de grupo, se había administrado oralmente, y la dexametasona (10  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ ), o el agua potable (100  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ ) como grupos de control, se habían administrado oralmente durante 8 semanas. Para comparar el progreso de los síntomas de la dermatitis, se midió la frecuencia del rascado de los ratones (el tiempo que pasaron rascándose durante 20 minutos de observación) cuando los ratones habían alcanzado la edad de 12 y 14 semanas. Los ratones de 16 semanas de edad se sacrificaron, midiéndose mediante el procedimiento ELISA la cantidad del nivel sérico de IgE, IgG1 e IgG2a. Asimismo, para comparar la producción de citocinas Th1/Th2, se prepararon esplenocitos mediante el procedimiento convencional a partir de cada animal, se transfirieron a una placa de 24 pocillos ( $5 \times 10^6$  células/ml/pocillo), y se incubaron con ConA (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 3 días, midiéndose entonces mediante ELISA los niveles de IL-4, IL-5, IL-12 y de interferón- $\gamma$ .

Se confirmó que el extracto del fruto endurecido del kiwi inhibió los síntomas de rascado tanto como la dexametasona, un agente antiflogístico esterooidal, cuando se midió la frecuencia del rascado (Véase figura 2a: el resultado de 12 semanas después del nacimiento, figura 2b: el resultado de 14 semanas después del nacimiento).

La Tabla 10 muestra que el nivel sérico de IgE de los ratones, a los que administró el extracto del fruto endurecido del kiwi, se redujo notablemente.

En la Tabla 11, la producción de IL-4e IL-5 disminuyó, y la producción del interferón- $\gamma$  e IL-12 aumentaron obviamente en los esplenocitos, que se prepararon a partir de los ratones a los que se había administrado el extracto del fruto endurecido del kiwi. El extracto del fruto endurecido del kiwi mejoró los síntomas de rascado, disminuyó la concentración de IgE en el suero, e inhibió la producción de citocina Th2 por los esplenocitos (de forma similar a la observada con la dexametasona), pero de forma distinta a ésta, aumentando significativamente el extracto del fruto endurecido del kiwi el nivel de IL-12 y de interferón- $\gamma$ , los cuales son bien conocidos por contribuir al alivio de las enfermedades alérgicas.

**TABLA 10**

	IgE	IgG1	IgG2a
Agua potable	$1.572,9 \pm 77,4$	$242,2 \pm 14,2$	$177,5 \pm 17,2$
Extracto del fruto endurecido del kiwi	$699,0 \pm 348,5$	$263,4 \pm 21,1$	$263,5 \pm 16,2$
Dexametasona	$130,0 \pm 55,3$	$247,3 \pm 10,8$	$148,0 \pm 14,8$
Unidad: pg/ml			



TABLA 11

	IL-4	IL-5	IL-12	Interferon- $\gamma$
Agua potable	151,9 $\pm$ 2,2	778,3 $\pm$ 34,1	1925,7 $\pm$ 134,5	10407,5 $\pm$ 130,8
Extracto del fruto endurecido del kiwi	24,1 $\pm$ 5,2	248,0 $\pm$ 17,8	2346,2 $\pm$ 98,4	15847,9 $\pm$ 1693,1
Dexametasona	42,7 $\pm$ 19,4	646,5 $\pm$ 51,7	201,2 $\pm$ 12,1	10096,4 $\pm$ 192,4
Unidad: pg/ml				

### Ejemplo experimental 8. Ensayo de toxicidad

5 Para examinar la toxicidad del extracto del fruto endurecido del kiwi, se llevaron a cabo en los ratones ensayos repetidos de toxicidad.

10 Las 10 hembras de ratones Balb/c, se dividieron en 2 grupos, y el extracto del fruto endurecido del kiwi de la invención (150 mg/kg), se administró a los ratones a la dosis de 150 mg/kg durante cuatro semanas, administrándose agua al grupo control. Se observaron síntomas de toxicidad durante 4 semanas tales como cambios ponderales, en el análisis hematológico y en el ensayo histológico.

15 Como resultado del experimento, no se produjeron muertes en los ratones a los que se les administró 150 mg/kg del fruto endurecido del kiwi de la invención, no apreciándose anomalías significativas en la ganancia de peso, en la ingesta calórica alimenticia, en los análisis hematológicos, o en los ensayos histológicos, etc. De acuerdo con los resultados mencionados, se confirmó que el fruto endurecido del kiwi era seguro.

- 20 (1) observación ponderal y comportamental: No se observó un cambio no usual del peso o del comportamiento.
- (2) Análisis hematológico: No se observaron síntomas anormales en el número de leucocitos, linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, RBC, hemoglobinas o plaquetas.
- 25 (3) Pruebas bioquímicas séricas: No se observaron síntomas anormales en el nivel de AST, ALT, LDH, bilirrubina, creatinina, glucosa, colesterol, minerales, albúmina, BUN, lipasa o amilasa séricas.
- (4) Ensayo histológico: No se observaron síntomas anormales en el tejido de riñones, bazo, hígado o timo.

30 A continuación se describirán los procedimientos de formulación y los tipos de excipientes, pero esta invención no se limita a ellos. Los ejemplos representativos de la preparación se describen de la siguiente forma.

### Preparación de la inyección

Extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi del Ejemplo 1	50 mg
Metadisulfito sódico	3,0 mg
Metilparaben	0,8 mg
Propilparaben	0,1 mg
Agua destilada para inyección	Cantidad óptima

35 La preparación de la inyección se llevó a cabo mezclando los componentes mencionados, obteniendo 2 ml mediante el procedimiento convencional y rellenando entonces esta muestra de 2 ml con todos los componentes y esterilizando mediante un procedimiento convencional de preparación de la inyección.

### Preparación del comprimido

40

Extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi del Ejemplo 1	50 mg
Almidón de maíz	100 mg
Lactosa	100 mg
Estearato magnésico	2 mg

La preparación de los comprimidos se llevó a cabo mezclando los componentes anteriores y comprimiéndolos.

### Preparación de la cápsula

Extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi del Ejemplo 1	100 mg
Almidón de maíz	100 mg
Lactosa	100 mg

Talco	2 mg
Estearato magnésico	cantidad óptima

La preparación de la cápsula se llevó a cabo mezclando los componentes anteriores y rellenando la cápsula de gelatina mediante el procedimiento convencional de preparación de la gelatina.

**5 Preparación del líquido**

Extracto etanólico del 70% del fruto endurecido del kiwi	100 mg
Azúcar	20 g
Fructosa	20 g
Sabor a limón	cantidad óptima
Agua destilada	100 ml

10 La preparación líquida se llevó a cabo mezclando los componentes anteriores y rellenando entonces un recipiente de color oscuro (marrón) de 100 ml, y esterilizando mediante un procedimiento convencional de preparación del líquido.

**Preparación de alimentos para el cuidado de la salud**

Extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi del Ejemplo 1	1.000 mg
Mezcla vitamínica	20 g
Vitamina A acetato	70 µg
Vitamina E	1,0 mg
Vitamina B <sub>1</sub>	0,13 mg
Vitamina B <sub>2</sub>	0,15 mg
Vitamina B6	0,5 mg
Vitamina B12	0,2 µg
Vitamina C	10 mg
Biotina	10 µg
Amida del ácido nicotínico	1,7 mg
Ácido fólico	50 µg
Ácido pantoténico calcio	0,5 mg
Mezcla mineral	cantidad óptima
Sulfato ferroso	1,75 mg
Óxido de cinc	0,82 mg
Carbonato magnésico	25,3 mg
Fosfato monopotásico	15 mg
Fosfato dicálcico	55 mg
Citrato potásico	90 mg
Carbonato cálcico	100 mg
Cloruro magnésico	24,8 mg

15 La mezcla de minerales y vitaminas anteriormente mencionada puede variar de muchas formas. Dichas variaciones no deben considerarse como una desviación del espíritu y alcance de la presente invención.

**Preparación de bebidas saludables**

Extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi del Ejemplo 1	1.000 mg
Ácido cítrico	100 mg
Oligosacárido	100 g
Concentración de albaricoque	2 g
Taurina	1 g
Agua destilada	900 ml

20 La preparación de las bebidas para la salud se llevó a cabo disolviendo los componentes activos, mezclándolos, agitándolos a 85°C durante 1 hora, filtrándolos, y entonces rellenando con todos los componentes una muestra de 2.000 ml, y esterilizando mediante un procedimiento convencional de preparación de las bebidas sanas.

**25 Preparación de lociones dérmicas**

Extracto acosa del fruto endurecido del kiwi del Ejemplo 1	1,00 (%)
--	----------

Glicerol	3,00
Etanol	1,00
Propilenglicol	0,10
Aroma	trazas
Agua destilada	hasta el 100%

La preparación dérmica se llevó a cabo disolviendo el componente activo según el procedimiento convencional de preparación de la loción.

5 **Preparación de la loción**

Extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi del Ejemplo 1	3,00 (%)
Ácido L-ascórbico-2-fosfato magnésico	1,00
Colágeno soluble (solución al 1%)	1,00
Ácido cítrico sódico	0,10
Ácido cítrico	0,05
1,3-butilenglicol	3,00
Agua destilada	hasta el 100%

La preparación de la loción se llevó a cabo disolviendo el componente activo según el procedimiento convencional de preparación de la loción.

10

**Preparación de la crema**

Extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi del Ejemplo 1	3,00 (%)
Poliethylenglicomonosterato	2,00
Monosterato de glicerina	1,00
Alcohol cetílico	4,00
Escualeno	6,00
Tri 2-gliceril etilhexanoato	6,00
Esfingo-glicolípido	1,00
1,3-butilenglicol	7,00
Agua destilada	hasta el 100%

**Preparación de la compresa**

15

Extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi del ejemplo 1	5,00 (%)
Alcohol polivinílico	13,00
Ácido L-ascórbico-2-fosfato magnésico	1,00
Lauroilhidroxiprolina	1,00
Colágeno soluble (solución al 1%)	2,00
1,3-butilenglicol	3,00
Etanol	5,00
Agua destilada	hasta el 100%

La preparación de la compresa se llevó a cabo disolviendo el componente activo según el procedimiento convencional de preparación de la compresa.

20 **Preparación de la solución de belleza**

Extracto acuoso del fruto endurecido del kiwi del Ejemplo 1	2,00 (%)
Hidroxietilcelulosa (solución al 2%)	12,00
Goma xantana (solución al 2%)	2,00
1,3-butilenglicol	3,00
Glicerina concentrada	4,00
Hialuronato sódico	5,00
Agua destilada	hasta el 100%

La preparación de la solución de belleza se llevó a cabo disolviendo el componente activo según el procedimiento convencional de preparación de la solución de belleza.

25 Habiendo así descrito la invención, es obvio que pueden introducirse diversas variaciones. Dichas variaciones no

deben considerarse como una desviación en el espíritu y alcance de la presente invención y como apreciará el experto en la materia, se tiene la intención de que dichas modificaciones se incluyan en el alcance de las reivindicaciones siguientes.

**5 Aplicabilidad industrial**

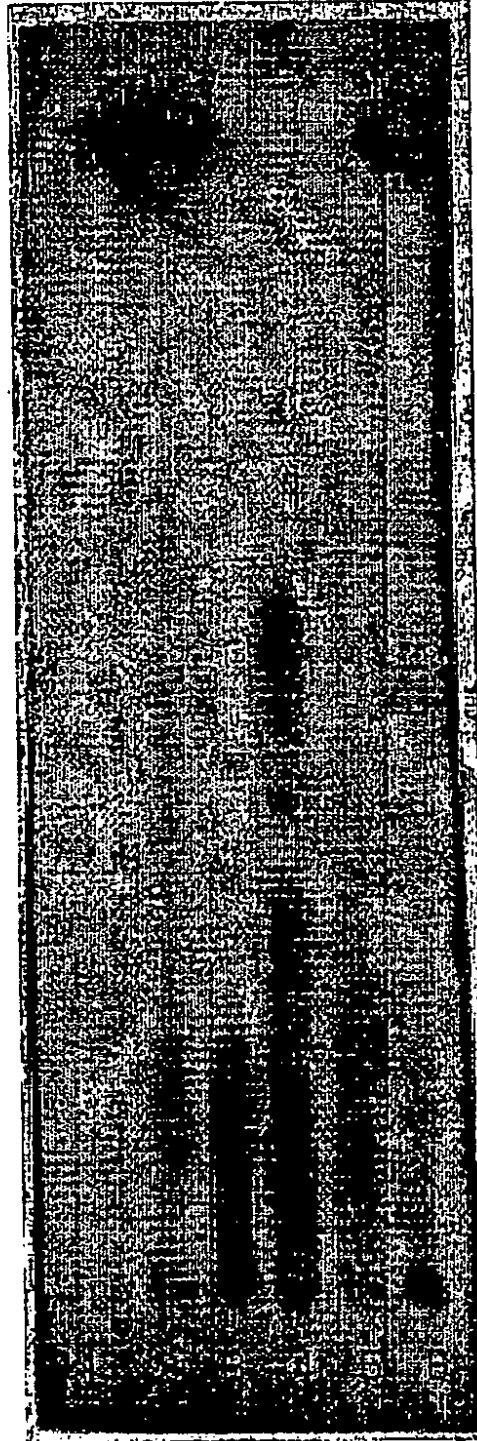
10 Tal como se describe en la presente invención, un extracto del fruto del kiwi, obtenido mediante la preparación de la invención, aumenta los niveles séricos de las citocinas Th1 y de IgG2a, reduce los niveles séricos de las citocinas Th2 e IgE, inhibe la liberación de histamina a partir de las células cebadas, y suprime la reacción inflamatoria. Según esto, el fruto endurecido del kiwi, puede utilizarse como una composición farmacéutica para el tratamiento y prevención de las enfermedades alérgicas, tales como la anafilaxia, rinitis alérgica, asma, dermatitis atópica, alergias alimentarias y urticaria, y enfermedades inflamatorias no alérgicas.

15 Además un extracto del fruto endurecido del kiwi puede utilizarse como una composición alimenticia saludable, para el tratamiento y prevención de una enfermedad alérgica, tales como anafilaxia, rinitis alérgica, asma, dermatitis atópica, alergias alimentarias, urticaria y enfermedades inflamatorias no alérgicas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Alimento para la salud que comprende el extracto en bruto o un extracto soluble en un disolvente no polar de *Actinidia arguta*, *Actinidia kolomikta* o *Actinidia polygama*, junto con un aditivo sitológicamente aceptable, para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica.
- 10 2. Alimento para la salud según la reivindicación 1 para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica, en el que el extracto se prepara utilizando cualquiera de entre fruto, tallo o raíz de *Actinidia arguta*, *Actinidia kolomikta* o *Actinidia polygama*.
- 15 3. Alimento para la salud según la reivindicación 1, para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica, en el que dicha enfermedad alérgica comprende anafilaxia, rinitis alérgica, asma, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis contagiosa, urticaria, alergia a los insectos, alergia alimentaria y alergia medicamentosa.
- 20 4. Alimento para la salud según la reivindicación 1, para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica, en el que dicho extracto en bruto es soluble en un disolvente polar seleccionado de entre agua destilada, alcoholes inferiores, o sus mezclas.
- 25 5. Alimento para la salud según la reivindicación 4, en el que dicho extracto en bruto es soluble en agua destilada o en etanol al 70%.
- 30 6. Alimento para la salud según la reivindicación, para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica, estando la cantidad de dicho extracto comprendida entre 0,01 y 80% en peso, sobre la base del peso total de la composición.
- 35 7. Aditivo alimenticio que comprende el extracto en bruto de *Actinidia arguta*, *Actinidia kolomikta* o *Actinidia polygama*, para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica.
- 40 8. Aditivo alimenticio según la reivindicación 7, para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica, en el que dicho extracto en bruto comprende por lo menos uno seleccionado de entre lactosa, caseína, dextrina, glucosa, sacarosa y sorbitol.
- 45 9. Aditivo alimenticio según la reivindicación 7, para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica, estando la proporción de dichos aditivos comprendida entre aproximadamente 0 y 20% peso/peso por 100% peso/peso de la presente composición.
- 50 10. Aditivo alimenticio según la reivindicación 7, para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica, en el que dichos aditivos alimenticios pueden añadirse a los alimentos mediante un procedimiento de deposición, pulverización o mezcla.
- 55 11. Aditivo para pienso que comprende el extracto en bruto de *Actinidia arguta*, *Actinidia kolomikta* y *Actinidia polygama*, para su utilización en la prevención o el tratamiento de una enfermedad alérgica en los animales.
12. Aditivo para pienso según la reivindicación 11, para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica en el que dicho extracto en bruto es soluble en un disolvente polar seleccionado de entre agua destilada, alcoholes inferiores tales como etanol, metanol, butanol, o sus mezclas.
13. Aditivo para pienso según la reivindicación 11, para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica, en el que dicho aditivo para pienso está previsto como líquido, polvo o gránulo.
14. Aditivo para pienso según la reivindicación 11, para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica, en el que dichos aditivos para pienso pueden añadirse al pienso mediante un procedimiento de deposición, pulverización o mezcla.
15. Composición para pienso que comprende cualquiera de los aditivos para pienso tal como se expone en las reivindicaciones 11 a 14 para su utilización en la prevención o la mejora de una enfermedad alérgica.

Fig. 1a



**Fig. 1b**

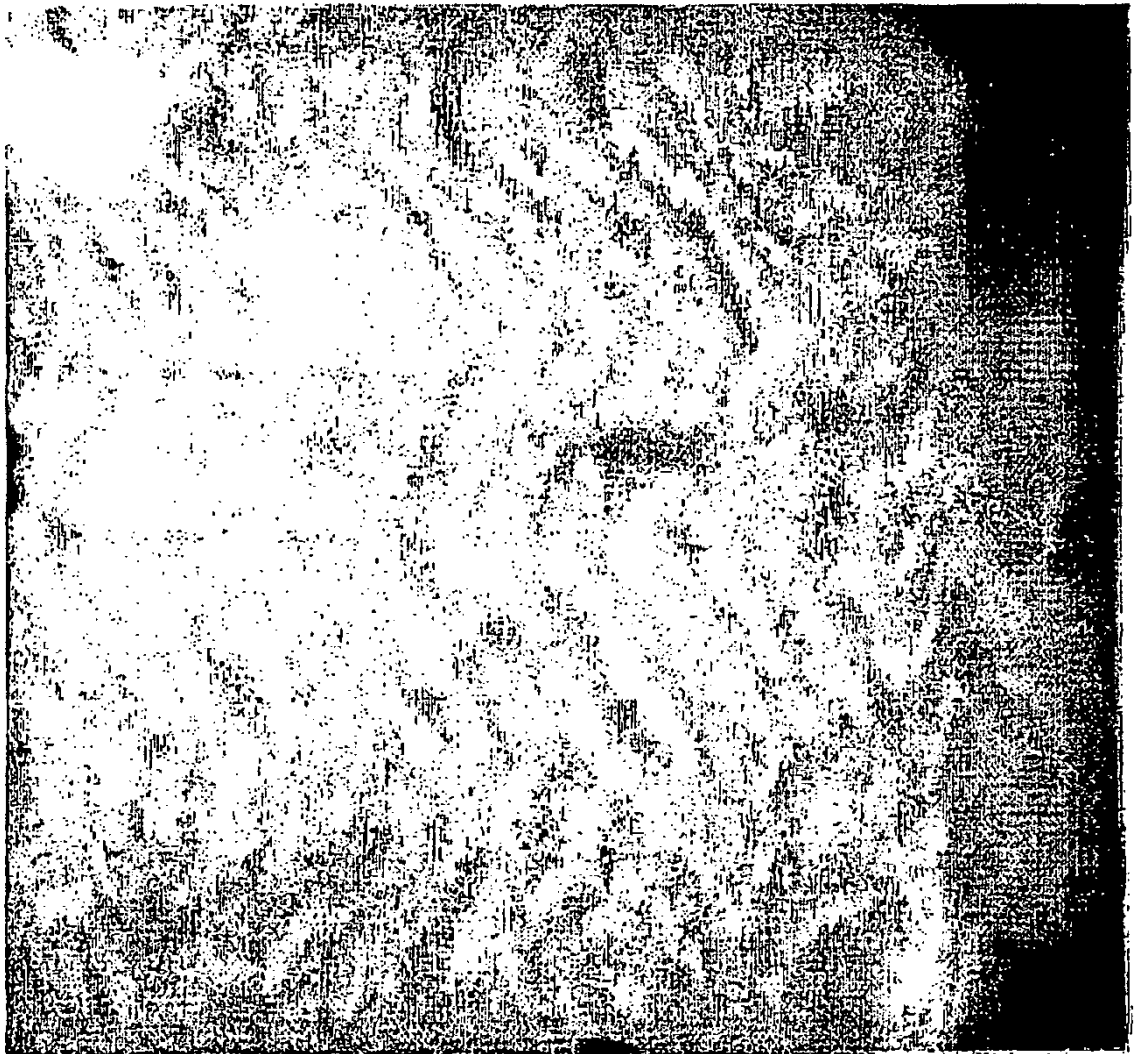


Fig. 1c

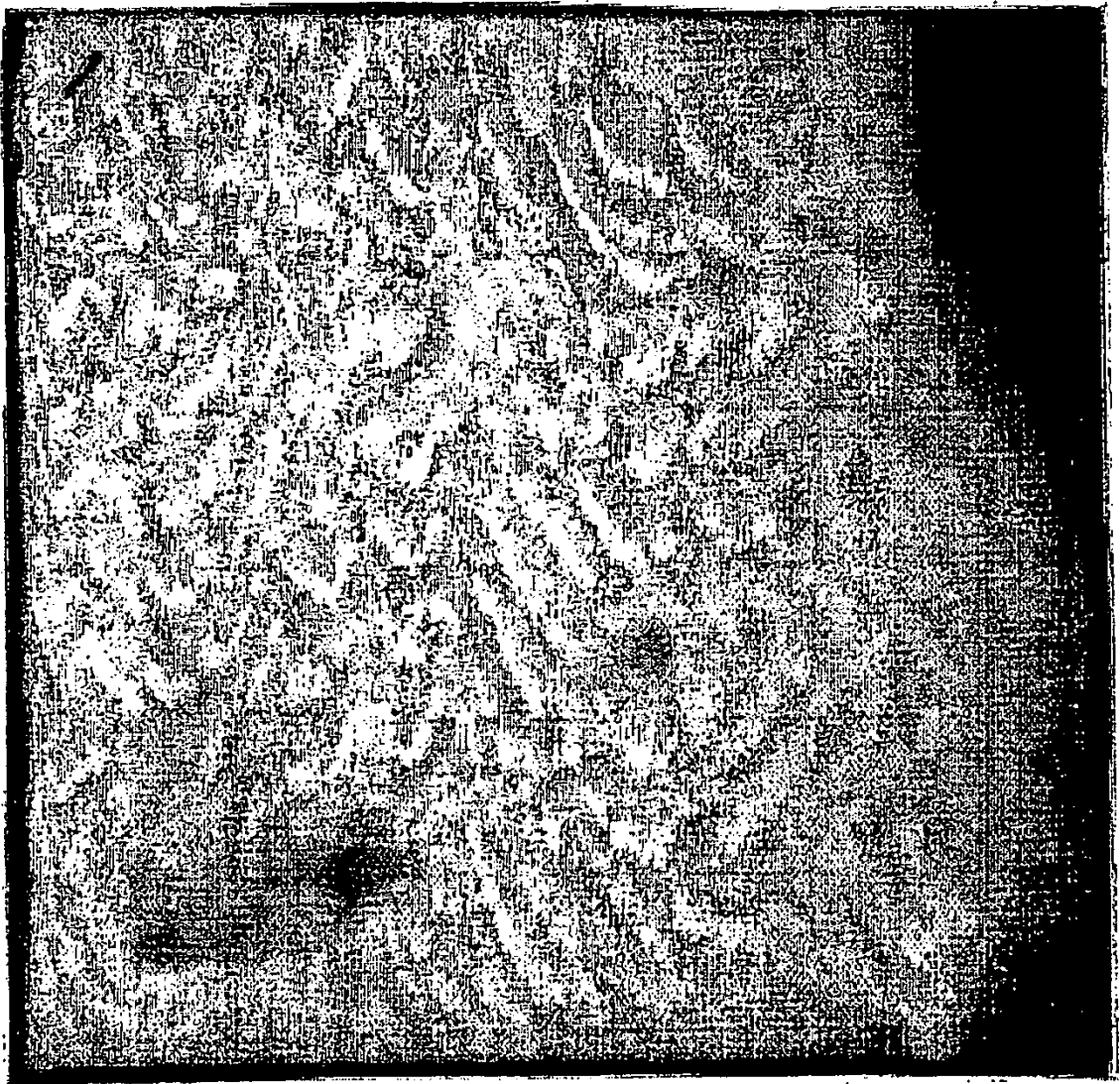




Fig. 2a

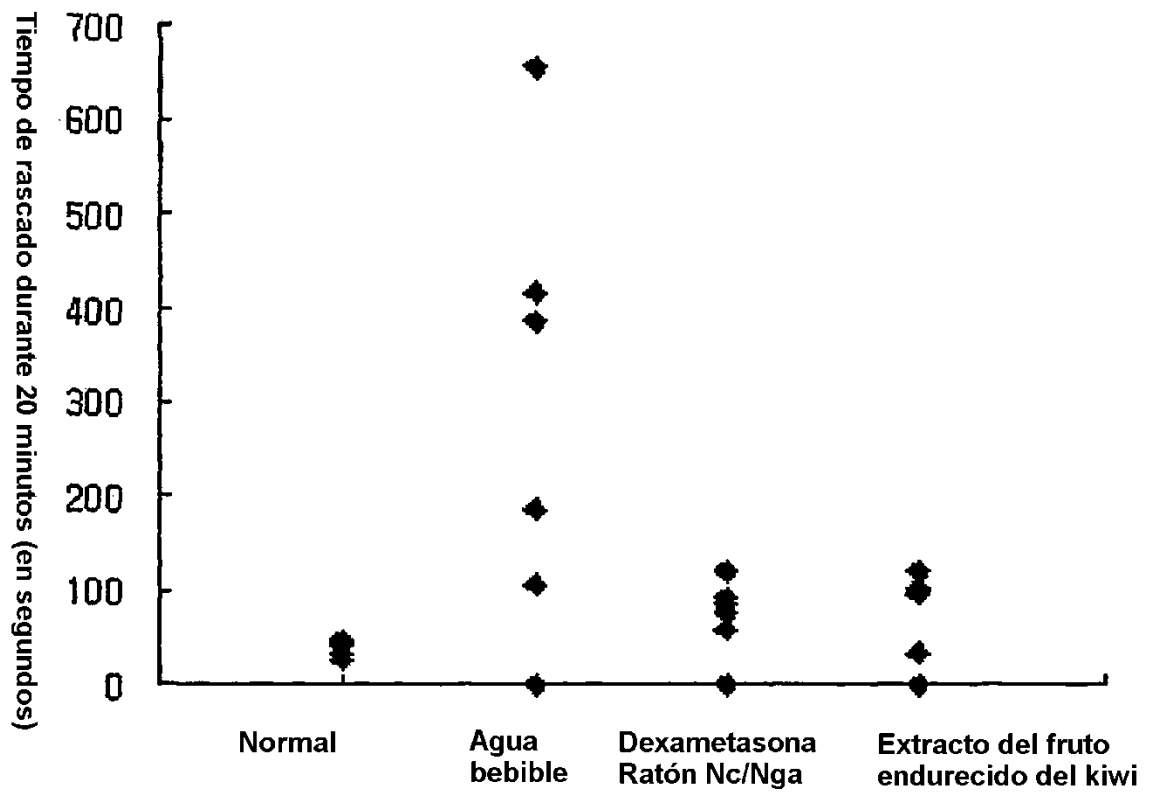


Fig. 2b

