

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 690**

51 Int. Cl.:

A61K 36/06 (2006.01)
A61K 36/07 (2006.01)
A61K 36/074 (2006.01)
A61K 36/068 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2006 E 06804268 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 1940433**

54 Título: **Composiciones que comprenden extracto de *Hypsizygus ulmarius***

30 Prioridad:

01.10.2005 US 722631 P
01.10.2005 US 722223 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.12.2013

73 Titular/es:

ELC MANAGEMENT LLC (100.0%)
767 FIFTH AVENUE
NEW YORK, NY 10153, US

72 Inventor/es:

CHEN, CHIA;
WEIL, ANDREW y
STAMETS, PAUL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 433 690 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

Composiciones que comprenden extracto de *Hypsizyugus ulmarius*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a los campos de la cosmética y la dermatología, específicamente a composiciones anti-inflamatorias tópicas que comprenden extractos de hongos.

Antecedentes

10 La respuesta natural de tejido humano sano a daños o ataques es la inflamación. Los tejidos del cuerpo humano pueden ser atacados o pueden verse comprometidos por una diversidad de factores, incluyendo infección microbiana, materia extraña no viviente, radiación ionizante y estrés oxidativo. Bajo las condiciones adecuadas, la inflamación puede estar presente en prácticamente todos los tipos de tejidos en el cuerpo humano, incluyendo los órganos principales (corazón, cerebro, hígado, riñones, etc.) y la piel. Por la expresión "estrés oxidativo" los inventores quieren significar los cambios no deseados en los tejidos animales que son causados por especies reactivas de oxígeno (pro-oxidantes) presentes en el tejido. El estrés oxidativo se desarrolla a través de un desequilibrio en el que los efectos de los pro-oxidantes dominan sobre los efectos de los anti-oxidantes. Los ejemplos de pro-oxidantes que se acumulan en los tejidos humanos incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, por ejemplo, superóxido y peróxido de hidrógeno. Las especies de oxígeno reactivo son el resultado del metabolismo normal de las células, pero en condiciones equilibradas sus efectos destructivos son controlados por los antioxidantes en el organismo. Los ejemplos de dichos antioxidantes son superóxido dismutasa y catalasa.

Leucotrieno B4

20 La comprensión de la síntesis y el papel del leucotrieno LTB₄, un agente pro-inflamatorio potente, es útil para el desarrollo de una apreciación de la presente invención. Después de un estímulo inflamatorio, una primera etapa en una compleja cascada de reacciones es una afluencia de iones de calcio en ciertas células. Estas células pueden incluir neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, mastocitos, basófilos y linfocitos B. En el interior de estas células, los iones de calcio entrantes y el ATP se unen a 5-lipoxigenasa inactiva y esto conduce a la translocación de la 5-lipoxigenasa fuera del citosol y a la membrana celular, donde se ancla a la proteína activadora de la 5-lipoxigenasa (FLAP). El influjo de iones de calcio provoca también la translocación de la fosfolipasa A2 desde el citosol a la membrana celular, donde escinde un éster de glicerol de ácido araquidónico. El éster de glicerol de ácido araquidónico es un componente fosfolípido natural de la membrana celular y cuando es escindido por la fosfolipasa A2, libera ácido araquidónico, un ácido graso insaturado, en el citosol. Otros mecanismos de liberación de ácido araquidónico en el citosol incluyen la acción de ciertas citocinas, concretamente, el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina-1 (IL1). Independientemente, una molécula de ácido araquidónico liberada se une a una molécula de 5-lipoxigenasa translocada y se convierte en ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE). A su vez, una molécula de 5-lipoxigenasa citosólica actúa sobre el 5-HPETE para formar leucotrieno A4 (LTA₄) que, a continuación, es liberado en el citosol. Algunos LTA₄ pueden ser secretados por la célula, mientras algunos LTA₄ permanecen en la célula y son hidrolizados en leucotrieno B4 (LTB₄) bajo la acción de LTA₄ hidrolasa. El LTA₄ secretado puede ser captado por las células que no producen LTA₄ por sí mismas, pero que, sin embargo, son capaces de convertir LTA₄ en LTB₄. Estas células pueden ser consideradas como una fuente secundaria de LTB₄. Una vez producido, en las células primarias o secundarias, el LTB₄ pasa a través de la membrana celular al entorno extracelular. El LTB₄ secretado inicia una serie de acciones celulares y moleculares que dirigen, así como amplifican, el proceso inflamatorio. El LTB₄ tiene una serie de funcionalidades que le permiten dirigir esta etapa del proceso inflamatorio. En términos generales, el LTB₄ tiene propiedades quimiotácticas, quimiocinéticas, vasoactivas, de mediación del dolor, inmuno-moduladoras y otras propiedades. También estimula la desgranulación y la producción de superóxido en el interior de los leucocitos.

45 Después de su secreción, el LTB₄ atrae a la zona afectada, neutrófilos que circulan en la sangre. El LTB₄ es un potente agente quimiotáctico para los neutrófilos que expresan los receptores quimioatrayentes apropiados. Se ha demostrado que incluso una aplicación tópica de LTB₄ a la piel humana promueve la infiltración de neutrófilos en el sitio de aplicación; véase "Production of Intraepidermal Microabscesses by Topical Application of Leukotriene B₄", R. Camp, et al., Journal of Investigative Dermatology, 1984, 82, 202-207. Esta y todas las referencias citadas se incorporan en su totalidad a la presente memoria, por referencia. El LTB₄ se une a los receptores en la superficie de los neutrófilos y esto inicia la formación de las estructuras necesarias para la motilidad. Después de haber atraído a los neutrófilos en la sangre al sitio de la inflamación, el LTB₄ induce la adhesión de esos neutrófilos al endotelio del vaso sanguíneo. El LTB₄ aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos y después de la adhesión al endotelio, los neutrófilos pasan a través del endotelio y al entorno de las células del estroma en el sitio de la lesión o infección. Los neutrófilos son dirigidos por la actividad quimiotáctica del LTB₄, lo que significa que los neutrófilos se mueven en la dirección de la concentración creciente de LTB₄. En este punto, la función principal de los neutrófilos es la fagocitosis. Los neutrófilos se adhieren a, y a continuación engullen, los organismos y desechos no deseados en los espacios extracelulares del tejido inflamado. En este momento, el sitio de la inflamación se infunde con exudado inflamatorio,

una composición edematosa de productos pro-inflamatorios, metabolitos y desechos. Los neutrófilos usan potentes enzimas y agentes microbianos nocivos para realizar la fagocitosis. En otro de sus funciones importantes, el LTB4 influencia a los neutrófilos fagocíticos para liberar cantidades de glucuronidasa y lisozima al medio extracelular, donde desempeñan un papel beneficioso en la descomposición del exudado inflamatorio agudo y el tejido dañado.

5 Interleucina-1 β

Aparte de LTB4, la presente invención se refiere al papel desempeñado por la interleucina-1 β (IL-1 β), una citoquina pro-inflamatoria. Aunque el LTB4 puede desempeñar un papel en la inducción de la adhesión de los neutrófilos al endotelio, IL-1 β es directamente responsable de la adhesión de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) al endotelio. IL-1 β induce la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales, una ocurrencia necesaria si los neutrófilos deben pasar desde la sangre al tejido afectado. IL-1 β está presente de manera natural en la piel humana y bloquea o antagoniza la función de IL-1 β en la adhesión, es generalmente anti-inflamatoria.

Inflamación aguda frente a crónica

La inflamación aguda y crónica se define de manera algo vaga en la literatura, pero es útil imaginarse cuatro situaciones en base a las presentaciones histológicas y clínicas. De esta manera, la inflamación aguda está caracterizada por la presencia de leucocitos polimorfonucleares (principalmente neutrófilos fagocíticos) en el sitio de la inflamación. Sin embargo, la inflamación aguda puede caracterizarse además por encontrarse en un estado de resolución o persistencia, dependiendo de la duración de tiempo desde el ataque inicial. La inflamación crónica es diferente de la inflamación aguda. La inflamación crónica puede ocurrir como una segunda etapa de la respuesta inflamatoria, después del fallo del proceso agudo para resolver completamente la situación, o puede ocurrir con una fase aguda. La inflamación crónica puede ser causada por una infección persistente, una irritación prolongada, una respuesta inmune celular, una respuesta inflamatoria aguda defectuosa, un trastorno autoinmune, el estilo de vida, un estrés psicológico prolongado, etc. La inflamación crónica se caracteriza por la presencia de células mononucleares (principalmente macrófagos fagocíticos, pero también linfocitos, monocitos y células plasmáticas) en el sitio de la inflamación, y, al igual que la inflamación aguda, puede ser clasificada como de resolución o persistente. Sólo hace relativamente poco tiempo, la ciencia médica ha identificado y evaluado el papel de la inflamación crónica del tejido en muchas etiologías de enfermedad. Es importante tener en cuenta que conforme progresa la inflamación, pueden ocurrir, simultáneamente, procesos agudos y crónicos, en estrecha proximidad entre sí.

Una vez infiltrados en el sitio de la inflamación, los neutrófilos guiados por LTB4 ejercen un control primario sobre la respuesta inflamatoria aguda, siendo la fagocitosis su actividad principal. Sin embargo, debería tenerse en cuenta también que los neutrófilos activados son una fuente principal de LTB4. De esta manera, existe la posibilidad de un bucle de retroalimentación de amplificación en el que el LTB4 dirige el reclutamiento y la activación de los neutrófilos a un sitio de inflamación y esos neutrófilos producen y liberan más LTB4, que reclutan más neutrófilos. En un punto posterior en la etapa aguda, un número relativamente pequeño de macrófagos y linfocitos se infiltran también en el sitio para ayudar a eliminar restos de tejido y células dañadas, pero la histología está caracterizada todavía por los neutrófilos. Si la etapa aguda es incapaz de resolver el desorden y devolver el organismo a la homeostasis, puede producirse un cambio desde inflamación aguda a inflamación crónica, cuando los neutrófilos que se han infiltrado en el sitio de la inflamación envían una señal química que reduce adicionalmente el reclutamiento de neutrófilos y promueve la afluencia de células mononucleares. Los macrófagos activados dominan la etapa crónica de la inflamación. Realizan muchas de las mismas funciones que los neutrófilos, tales como la fagocitosis, pero pueden tener también un efecto más generalizado sobre el sistema. Además, los macrófagos son capaces de división celular y presentación de antígenos a los linfocitos. Los macrófagos dirigen la respuesta inflamatoria crónica y promueven la etapa de curación mediante la producción de una diversidad de citocinas (incluyendo LTB4) y factores de crecimiento. Por ejemplo, el TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) es responsable de una regulación a la baja de la función inflamatoria de los macrófagos, mientras que también los estimula para producir citoquinas, factores de crecimiento y colagenasas que apoyan la curación.

La resolución de la inflamación crónica requiere la eliminación de las células inmunes (macrófagos y leucocitos) de la zona afectada. Los leucocitos y macrófagos tienden a acumularse en un compartimiento tisular debido al reclutamiento y/o la proliferación local (división celular). La cantidad de neutrófilos, linfocitos y macrófagos se reduce en un compartimiento tisular por emigración y muerte celular. Bajo condiciones favorables de la respuesta inflamatoria, las células inmunes entran y salen del sitio de la inflamación a velocidades que impiden su sobreacumulación en la zona afectada. En contraste con la resolución de la inflamación crónica, la inflamación crónica persistente se produce cuando la emigración y la muerte celular no compensan el reclutamiento y la proliferación. Dicho desequilibrio, es una condición patológica y generalmente puede ocurrir cuando se producen, de manera inapropiada, señales químicas que inhiben la emigración y la muerte celular. Los mecanismos no se comprenden completamente. Con relación a los neutrófilos, un aspecto parece ser que las células estromales y fibroblastos en los tejidos afectados pueden liberar factor derivado de células estromales 1 (SDF-1), que es pro-retentivo para los neutrófilos, e interferón- β (INF- β), que es pro-supervivencia para los neutrófilos. Con relación a las células T activadas, las diversas interleucinas e interferones

de tipo I (INF- α e INF- β) inhiben la apoptosis y, por lo tanto, contribuyen a la persistencia de la inflamación. Un resultado de esta acumulación patológica de leucocitos es la liberación continua de enzimas lisosomales a través de la exocitosis. Tanto los neutrófilos como los macrófagos liberan cantidades de colágeno y enzimas que destruyen elastasa al entorno extracelular, donde desempeñan un papel beneficioso en la descomposición de exudado inflamatorio y tejido dañado. Sin embargo, estas enzimas no son discriminatorias y pueden digerir tejidos sanos. Si las cantidades de estas enzimas son excesivas, se producirá un daño significativo a los tejidos sanos. Además, las células fagocíticas liberan también metabolitos de oxígeno reactivo al entorno, que pueden atacar también a los tejidos sanos. Este ataque, en sí mismo, se convierte en un iniciador de la respuesta inflamatoria, extendiendo el estado inflamatorio durante días, meses o incluso años. De esta manera, en la inflamación crónica, especialmente persistente, los tejidos resultan dañados por el agente causante, así como por la respuesta inflamatoria a ese agente. De hecho, en la inflamación persistente, el agente causante original puede haber sido neutralizado hace mucho tiempo.

Hay una distinción importante a destacar en la presente memoria. Algunos tratamientos son antiinflamatorios porque neutralizan uno o más agentes causantes originales. Por ejemplo, una bacteria invasora puede causar inflamación. Si un tratamiento anti-bacteriano eficaz neutraliza la bacteria invasora, la inflamación puede disminuir. En este sentido, el tratamiento anti-bacteriano podría ser llamado anti-inflamatorio. Esto es diferente del foco de la presente invención. Por ejemplo, una bacteria invasora puede causar inflamación. Ahora, supóngase que la bacteria persiste durante un tiempo prolongado de manera que la inflamación se vuelve crónica persistente. A continuación, la bacteria invasora es neutralizada finalmente mediante un tratamiento anti-bacteriano específico, pero la inflamación continúa debido a su naturaleza persistente. En esta etapa, se aconseja un tratamiento cuyo objetivo es la inflamación. No es suficiente eliminar el agente causante inicial. Es posible que el tratamiento dirigido al agente causante original no tenga ningún efecto sobre la resolución de la inflamación persistente. La persona afectada necesita algo que entre en el proceso inflamatorio e interactúe con el proceso inflamatorio. La presente invención se refiere a tratamientos dirigidos a la inflamación. Las expresiones "dirigido a la inflamación", "composición anti-inflamatoria dirigida", "específico de antiinflamatorio" o similares, se refieren a una composición, procedimiento o tratamiento que interactúa directamente con el proceso inflamatorio, que no sea mediante la neutralización de uno o más agentes causantes originales, tal como se acaba de describir.

El LTB4 se ha visto implicado en una serie de trastornos inflamatorios persistentes de la piel y órganos internos, incluyendo psoriasis, eccema, eritema, acné, prurito, fibrosis, quística, artritis reumatoide, asma, alergias, colitis y otros. En todos ellos, se han observado niveles elevados de LTB4. Dichas afecciones se conocen, en general, como trastornos mediados por LTB4 y su estudio ha conducido al desarrollo de diversos inhibidores y antagonistas de LTB4 para el tratamiento de trastornos inflamatorios crónicos. Los antagonistas están dirigidos en su efecto, bloqueando el LTB4 de manera que no realice funciones específicas. Los inhibidores, por otra parte, bloquean la formación de LTB4 a partir de ácido araquidónico. Por lo tanto, potencialmente los inhibidores afectan a todas las funciones que dependen de LTB4 y esto puede tener consecuencias indeseables. Los procedimientos de inhibición de LTB4 incluyen la inhibición de 5-lipoxigenasa directamente, así como el bloqueo de la proteína de activación de 5-lipoxigenasa, de manera que la 5-lipoxigenasa no puede translocarse en la membrana celular. De cualquier manera, la cascada que conduce a la formación de LTA4 es interrumpida y no se produce LTB4. En contraste, los antagonistas bloquean la acción de LTB4 en uno o más receptores en los leucocitos y/o el endotelio. Frecuentemente, puede ser preferente controlar o influir en algunas actividades LTB4 y no otras. En esos casos, la inhibición de la producción de LTB4 está contraindicada mientras que se aconseja el antagonismo de LTB4. Como un ejemplo, durante un trastorno inflamatorio persistente con niveles de LTB4 crónicamente elevados, puede ser deseable interrumpir el proceso inflamatorio mediante la interrupción de la quimiotaxis mediada por LTB4 y adhesión mediada por IL-1 β de los neutrófilos. Sin embargo, para los neutrófilos que ya están presentes en el sitio de la inflamación, LTB4 todavía podría desencadenar la exocitosis y la liberación de cantidades de glucuronidasa y lisozima al entorno extracelular, donde desempeñan un papel beneficioso en la descomposición del exudado inflamatorio agudo y el tejido dañado. De esta manera, puede comprobarse el extremo frontal del proceso inflamatorio, mientras se permite que el extremo posterior proceda y se permite que la zona afectada salga del proceso inflamatorio. Cuando disminuye el proceso inflamatorio, los procesos de curación y reparación toman el control. En los mejores resultados de resolución, denominados "curación", la estructura del tejido permanece intacta o puede ser regenerada por la proliferación de células del tejido. En los peores resultados de resolución, denominados "reparación" u "organización", el tejido dañado es reemplazado por tejido cicatricial mediante el proceso de reparación normal del cuerpo. Si la curación o la reparación deben tener éxito, el proceso inflamatorio debe ser controlado y la posibilidad de un daño adicional debe ser reducida o eliminada. En general, la eficacia de cualquier tratamiento de afecciones que se caracterizan por niveles elevados persistentes de LTB4, es evaluada por la regresión o la prevención de los síntomas de la afección.

Hongos: inmuno-mejora frente a inmuno-supresión

Los hongos pertenecen a la familia Basidiomycota phylum del reino de los hongos. Los hongos enteros y los extractos de hongos se han usado durante siglos para una serie de efectos conocidos. Los procedimientos de uso incluyen la ingestión oral, la inyección subcutánea y la aplicación tópica. Al igual que cualquier sustancia biológicamente activa, los efectos específicos de los hongos dependen de diversos factores que incluyen la especie exacta de hongo, la parte

usada del hongo, el pre-procesamiento del hongo, el procedimiento de administración, la zona del cuerpo específica para el tratamiento, el régimen de tratamiento, etc.

5 Frecuentemente, las composiciones de hongos (especialmente composiciones comestibles) se publicitan por sus propiedades de mejora inmunológica y de mejora energética. Debería recordarse que la mejora inmunológica es pro-inflamatoria y, por lo tanto, las composiciones de este tipo son contrarias a las composiciones anti-inflamatorias de la presente invención. Además, muchos tipos diferentes de productos, incluyendo composiciones de hongos, afirman tener propiedades anti-envejecimiento. Pero la expresión "anti-envejecimiento", usada frecuentemente, no es específica y puede transmitir diferentes significados, incluso mutuamente excluyentes, dependiendo de la condición inicial de la persona sometida a un tratamiento anti-envejecimiento. De esta manera, por una parte, pro-inflamación (mejora inmunológica) puede ser anti-envejecimiento, mientras que, por otro lado, anti-inflamación (inmuno-supresión) puede ser anti-envejecimiento. Considérese una persona que ingiere una dieta equilibrada, hace ejercicio regularmente, no fuma ni consume alcohol en exceso, y no recibe cantidades perjudiciales de exposición solar. Conforme esta persona progresa más allá de la mediana edad, la función del sistema inmune (respuesta inflamatoria) se debilita con el tiempo, a pesar de todos los cuidados. En este caso, los tratamientos pro-inflamatorios podrían considerarse como "anti-envejecimiento". De manera alternativa, considérese una persona de treinta años con malos hábitos de comida, que no hace ejercicio, fuma a diario, consume más de seis gramos de alcohol por día y trabaja al aire libre. A los treinta, esta persona puede tener una respuesta inflamatoria no disminuida, pero debido a constantes estímulos externos, esa respuesta siempre puede ser activada, es decir crónica, lo que conduce daño del tejido sano. En este caso, los tratamientos antiinflamatorios deberían ser considerados como tratamientos anti-envejecimiento. En resumen, la "mejora inmunológica" implica propiedades pro-inflamatorias, mientras que el "anti-envejecimiento" podría implicar propiedades pro- o anti-inflamatorias.

Este punto fue enfatizado en un artículo titulado "Mycological Medicine" Edición Enero de 2002 de Functional Foods & Nutraceuticals). El autor señaló: "Como potentes moduladores y potenciadores inmunes, los hongos medicinales están contraindicados para una serie de afecciones autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico y trastornos autoinmunes del colágeno". Insistiendo en este punto, una revisión por un homólogo, que aparece inmediatamente después del artículo, afirmó, "" Está claro que el uso de los extractos de hongos medicinales tiene su lugar en el tratamiento de ciertas enfermedades crónicas, incluyendo el cáncer. Sin embargo, el autor destaca que el uso de dichos extractos no se aconseja en ciertas condiciones, tales como estados autoinmunes. Esta es una advertencia bien fundada, ya que *estos extractos mejoran el funcionamiento de las células inflamatorias, y la potenciación de la actividad de dichas células no es aconsejable cuando la inflamación crónica forma parte de la patogénesis de la enfermedad*". Por lo tanto, una composición, aunque afirme ser anti-envejecimiento, no tiene necesariamente un efecto anti-envejecimiento para todas las personas tratadas con esa composición. Además, dos composiciones que tienen uno o más hongos en común, no tienen necesariamente el mismo efecto general en todas las personas tratadas, incluso si ambas composiciones afirman ser anti-envejecimiento. Depende de cómo y en quién se usan las composiciones. Ni que decir tiene que las composiciones que comprenden extractos de hongos taxonómicamente diferentes, no se comportan generalmente de la misma manera.

Como se ha señalado, ciertos hongos pueden ser usados para mejorar la función inmune. Citando de nuevo el artículo "Mycological Medicine", "la potente actividad de potenciación y modulación inmune de los hongos medicinales ayuda, soporta y mejora la función inmune general. Los investigadores están encontrando también que los hongos pueden estimular directamente tanto respuestas inmunes básicas (*linfocitos, neutrófilos, etc.*) como secundarias (inmunoglobulinas IgE, IgA, IgG) del sistema inmune. Este estímulo puede aumentar la producción de defensores inmunes, tales como citocinas y macrófagos, que desempeñan papeles vitales en el reconocimiento y la eliminación de antígenos extraños, así como la liberación de mediadores químicos, incluyendo la interleucina-1". Citando también, "Las sustancias que se ha encontrado que potencian el sistema inmune incluyen beta-glucanos, lentininas, polisacáridos, complejos de polisacárido-péptido, triterpenoides, nucleósidos y otros metabolitos secundarios. Muchas de estas sustancias bioactivas, a través de sus efectos estimulantes sobre el sistema inmunitario, muestran una potente actividad antitumoral, anti-mutagénica y anti-cancerígena". Los puntos a destacar son que se cree que ciertos hongos aumentan la producción de citoquinas y estimulan la actividad de los neutrófilos, es decir, ciertos hongos son capaces de actividad pro-inflamatoria. También se cree que, al menos en algunos casos, los polisacáridos y glucanos encontrados en los hongos estimulan el sistema inmune, es decir, son pro-inflamatorios. El autor explica, "Los beta-glucanos se unen a los macrófagos y otros glóbulos blancos fagocíticos en ciertos receptores y activan su actividad anti-infección y anti-tumoral estimulando la producción de radicales libres. Esto, a su vez, señala a las células inmunes fagocíticas a engullir y destruir cuerpos extraños, ya sean bacterias, virus o células tumorales". De esta manera, muchos de los usos publicitados de los extractos de hongos como anti-bacterianos, anti-virales, anti-mutagénicos, agentes de mejora cardiovascular, etc., son debidos a la capacidad de los hongos para hacer frente a estas afecciones mediante la estimulación del sistema inmunológico y el proceso inflamatorio. Por último, debe recordarse que los polisacáridos y los beta-glucanos representan grandes clases de moléculas. Nada de lo conocido en el campo enseña o sugiere que todos los polisacáridos o todos los beta-glucanos sean pro-inflamatorios. Como mucho, puede decirse que algunos polisacáridos y beta-glucanos son capaces de intervenir en el proceso inflamatorio.

La piel sana, al igual que todos los órganos del cuerpo y el cuerpo como un todo, debe mantener un estado de homeostasis. En general, la homeostasis se ve interrumpida por un exceso o una deficiencia, mientras que el resultado es una integridad de la piel comprometida. De esta manera, las arrugas en la piel y otros signos de envejecimiento de la piel pueden ser un resultado de debilidad inmunológica o hiper actividad inmunológica (es decir, inflamación crónica).

5 Por ejemplo, en personas con envejecimiento cronológico, la piel se adelgaza con el tiempo y puede resultar dañada más fácilmente, teniendo al mismo tiempo una menor capacidad de autocuración. Al igual que se reduce el flujo de sangre en la piel senil, también se reduce la respuesta inmunológica. Los tratamientos tópicos que inhiben la inflamación en la piel pueden estar contraindicados para esas personas. Por otro lado, el eccema y la psoriasis son trastornos hiperinflamatorios para los cuales pueden estar indicadas las composiciones anti-inflamatorias dirigidas.

10 Además de las capacidades disminuidas que acompañan el envejecimiento cronológico y a las afecciones autoinmunes, la piel humana de cualquier edad se ve afectada por factores exógenos o endógenos, muchos de los cuales son deteriorativos. Estos factores incluyen gravedad, exposición al sol, contaminación, tabaco, humo pasivo, productos farmacéuticos, dieta, trauma y otros. La mayoría de estos factores (tal vez no la gravedad) son inflamatorios para la piel y conducen a un deterioro de la red de colágeno y elastina en las capas superficiales de la piel. Este deterioro conduce a la pérdida de elasticidad y firmeza de la piel, lo que lleva a flacidez y arrugas de la piel. De esta manera, incluso en la población sustancialmente más joven, pueden producirse cambios en la piel que se manifiestan visiblemente como arrugas. Generalmente, estas manifestaciones visibles se denominan "envejecimiento prematuro" de la piel.

20 En la literatura se informa acerca de composiciones que contienen hongos que exhiben propiedades antiinflamatorias. El documento WO2005/067955 afirma que una cataplasma tópica de *Fomitopsis officinalis* (nombre común: Agarikon) ha sido usada contra la inflamación y que, en otras formas, el hongo se usa para tratar la tuberculosis. El artículo no es específico acerca de para qué tipos de inflamación es eficaz el tratamiento con cataplasma tópica. Tampoco es específico acerca de cómo preparar estas cataplasmas, tampoco se proporciona la concentración de *Fomitopsis*. Tampoco se describe qué partes del hongo usar y cómo preparar un extracto para su uso en la cataplasma. Los componentes descritos de este hongo son beta-glucanos, triterpenoides, agaricina y antibióticos, pero no hay ninguna explicación de cómo interviene la *Fomitopsis officinalis*, en todo caso, en el proceso inflamatorio. ¿Las composiciones indicadas neutralizan el agente causante original de la inflamación o son específicas las composiciones anti-inflamatorias? No es posible saberlo, ya que no se divulga ninguna composición.

25 Otras composiciones tópicas conocidas de extracto de hongo son las siguientes, sobre las que se ha informado que tratan o previenen el envejecimiento y las arrugas de la piel.

30 El documento KR 2004084581 se titula *Preservative Free Cosmetic Composition Containing The Extract of Dictyophora Indusiata To Prevent Skin Wrinkles, Wherein The Composition Displays High Antibacterial Effect And Is Thus Effective For Anti-Inflammation*. En el mismo se informa acerca de una composición cosmética libre de conservantes para la prevención de arrugas de la piel que contienen un extracto etanólico de *Dictyophora Indusiata mycelium*. La concentración del extracto es del 0,5-20% de la composición. Según se informa, la composición hidratante muestra un alto efecto antibacteriano y, de esta manera, es eficaz para la anti-inflamación. Tal como explica el propio título, cualquier actividad anti-inflamatoria de esta composición proviene de la actividad anti-bacteriana de la composición. A partir del título y los resúmenes disponibles, puede entenderse que quiere decir que una vez que la composición ha neutralizado las bacterias invasoras, la inflamación desaparecerá. Nada en el título o el resumen sugiere que el extracto de *Dictyophora Indusiata* intervenga directamente en el proceso inflamatorio. Más específicamente, nada en el título y el resumen sugiere que el extracto de *Indusiata Dictyophora* tenga ningún efecto sobre mediación de LTB4 de los neutrófilos. Esto es a diferencia de las composiciones de la presente invención que son específicas anti-inflamatorias y no influyen en la mediación de LTB4 de los neutrófilos.

45 El documento JP 1 1292785 describe una preparación tópica que contiene uno o más extractos de hongo *Agaricus blazei* y el filtrado del cultivo micelar, combinado con un eliminador de oxígeno activo. Según se informa, la composición inhibe el daño por rayos ultravioleta de las células de los fibroblastos dérmicos; previene la formación de lípidos peroxi causada por el oxígeno activo en la piel; es eficaz para la prevención y la mejora de las arrugas o el deterioro de la elasticidad de la piel; previene y mejora la inflamación y la aspereza de la piel. La composición contiene muchas especies activas diferentes del hongo *Agaricus*. Por ejemplo, los eliminadores de oxígeno activos incluyen: extractos de *Hamamelis*, *Quercus*, *Aesculus*, *Sanguisorba*, *Paeonia*, *Ginkgo biloba* L., árbol *Betulaceae*, perejil, carotenoides, flavonoides, taninos, superóxido dismutasa, ácido gálico y sus sales o derivados, hidroquinona, tiorredoxina y tiorredoxina reductasa. El documento JP 1 1228439 describe también una preparación que comprende un extracto de micelio de *Agaricus blazei* (preferentemente entre el 0,0001-5% en peso), al menos un tipo de sustancia fisiológicamente activa de origen animal (por ejemplo, un extracto de placenta o bazo de un mamífero, tal como un ser humano o ganado, proteína soluble membrana de cáscara de huevo, factor de crecimiento de fibroblastos básico o ácido, factor de crecimiento de células epiteliales, ácido nucleico), del 0,0001 al 3,0% en peso de un agente anti-inflamatorio, mucopolisacáridos (por ejemplo, ácido hialurónico) y un ácido 2-hidroxicarboxílico. Según se informa, la composición potencia un efecto hidratante y activa los fibroblastos epidérmicos para tratar los síntomas de

envejecimiento de la piel. El papel informado de Agaricus en estas composiciones es la activación de las células de fibroblastos dérmicos, que es parte de los procesos de cicatrización y reparación. Se ha informado, en general, que los beta-glucanos extraídos de estas especies de hongos a ser usadas en el tratamiento del cáncer, donde ayudan en la producción de interferón e interleucina (pro-inflamatoria). Además, se conoce que los beta-glucanos estimulan la actividad de los macrófagos (pro-inflamatoria). Por supuesto, estos tratamientos no son generalmente tópicos. El punto es que el uso de Agaricus en estas referencias no es específico anti-inflamatorio e incluso la presencia de un ingrediente anti-inflamatorio separado en el documento JP 1 1228439 indica que el Agaricus no está dirigido a la inflamación. Esto es diferente a las composiciones de la presente invención, en las que uno o más extractos de hongos son específicos anti-inflamatorios y no influyen en la mediación LTB4 de los neutrófilos.

5

Según se informa, el documento JP 63183537 describe un agente anti-inflamatorio que tiene baja toxicidad, que contiene un extracto de Heterobasidiae (por ejemplo, Auricularia auricula-judae, A. polytricha, A. mesentérica, etc.). Se informa de que los ingredientes activos del extracto son polisacáridos. Los polisacáridos son xilosa, manosa, ácido glucurónico, etc., en el caso de Auricularia auricula-judae. Los componentes extraídos de Auricularia auricula-judae se mezclan con diversas bases de fármacos en estado líquido, estado cremoso, etc., y se usan como un fármaco anti-inflamatorio. Preferentemente, la concentración de extracto usada es del 0,001-20,0% en peso.

15

Ninguna de las referencias anteriores divulga, ni los solicitantes son conscientes de composiciones de la técnica anterior que comprenden extracto de Hypsizygus ulmarius para su uso como un antagonista de LTB4 específico y/o antagonista de IL-1 β , en la piel. En la técnica anterior nada sugiere que el extracto de Hypsizygus ulmarius podría ser efectivo para la resolución de una inflamación persistente de la piel y mitigar, de esta manera, los efectos de la inflamación persistente, en particular, signos visibles del envejecimiento, tales como las arrugas. Ninguno de los documentos anteriores describe una composición tópica que comprende una cantidad anti-inflamatoria eficaz de extracto de Hypsizygus ulmarius, donde la acción anti-inflamatoria es antagonismo de LTB4 y/o LTB4 de IL-1 β .

20

Objetos de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

Un objeto principal de la presente invención es proporcionar composiciones tópicas según la reivindicación 1 y su uso para el tratamiento, la inhibición, la prevención o la inversión de los efectos de la inflamación persistente.

25

Otro objeto de la invención es proporcionar composiciones anti-inflamatorias específicas según las reivindicaciones que comprenden extracto de Hypsizygus ulmarius.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones tópicas y su procedimiento cosmético según las reivindicaciones para el tratamiento, la inhibición, la prevención o la inversión de los signos visibles del envejecimiento de la piel, particularmente las arrugas.

30

Otro objeto de la invención es proporcionar composiciones tópicas según las reivindicaciones que funcionan efectivamente como agentes anti-quimiotácticos para LTB4, aunque no interrumpen directamente la cascada del ácido araquidónico.

Otro objeto de la invención es proporcionar composiciones tópicas según las reivindicaciones que funcionen efectivamente como agentes anti-adhesión para IL-1 β .

35

Sumario de la invención

La presente invención incluye composiciones tópicas de extracto de Hypsizygus ulmarius en cantidades que son eficaces para influir en la quimiotaxis mediada por LTB4 y/o en un ejemplo de la presente divulgación, la adhesión de leucocitos polimorfonucleares, así como la adhesión mediada por IL-1 β de leucocitos polimorfonucleares. En un ejemplo de la presente divulgación, el extracto de Hypsizygus ulmarius puede ser usado solo o en combinación con agentes activos de la piel y anti-inflamatorios secundarios. Los agentes anti-inflamatorios secundarios pueden funcionar o no antagonizando la quimiotaxis mediada por LTB4 y la adhesión mediada por IL-1 β . El extracto puede ser incorporado en un vehículo cosméticamente aceptable. La presente invención incluye la composición reivindicada para su uso en el tratamiento de inflamación persistente de la piel mediante la aplicación a la piel inflamada de cantidades antiinflamatorias eficaces de extracto de Hypsizygus ulmarius. Preferentemente, las composiciones de la presente invención se usan para tratar la inflamación persistente de la piel mediada por LTB4.

40

45

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria descriptiva, se entenderá que los términos "comprenden", "comprende", "que comprende" y similares hacen referencia consistentemente a que una colección de objetos no está limitada a aquellos objetos citados específicamente.

50

Hypsizyugus ulmarius (conocido también como hongo del olmo, shirotamagitake) tiene la clasificación taxonómica siguiente: reino: Fungi, filo: Basidiomycota, clase: Basidiomycetes, orden: Agaricales, familia: Tricholomataceae, género: Hypsizyugus. Las especies ulmarius no deberían ser confundidas con otros miembros del género Hypsizyugus, concretamente circinatus, elongatipes, ligustri, marmoreus y tessulatus. Algunas referencias antiguas pueden confundir "ulmarius" y "tessulatus" pero, más recientemente, se han aclarado las diferencias entre estas especies.

Los extractos de Hypsizyugus ulmarius adecuados para su uso en la presente invención pueden prepararse a partir de hongos cosechados silvestres o cultivados. De manera alternativa, y preferentemente, los extractos se preparan a partir de hongos cultivados mediante un cultivo tisular, bajo condiciones reproducibles. Los cultivos pueden prepararse mediante procedimientos de clonación o a partir de esporas. La calidad y las características de los extractos preparados a partir de un cultivo tisular pueden ser reproducidas con mucha mayor fiabilidad que los silvestres o incluso en un campo de cultivo. En la naturaleza, Hypsizyugus ulmarius puede crecer en los árboles arce, de los que el hongo recibe sus nutrientes, a través de su red micelar enterrada en el tronco del árbol. Se puede apreciar que habrá una variación en la composición de los hongos Hypsizyugus ulmarius salvajes dependiendo del árbol exacto en el que crece el hongo, la edad del árbol, la ubicación en el árbol, la cantidad de luz solar recibida por el árbol, la estación, la hora del día, etc. En contraste, los componentes de los hongos Hypsizyugus ulmarius producidos mediante cultivo tisular son significativamente más uniformes, predecibles y controlables. Por lo tanto, los hongos Hypsizyugus ulmarius cultivados mediante cultivo tisular son preferentes. Los extractos de hongos producidos de esta manera están disponibles comercialmente en Fungi Perfecti[®] LLC, Olympia, WA 98507.

Los extractos útiles en la presente invención se obtienen con un disolvente etanólico. En general, cuanto mayor es el porcentaje de etanol usado para la extracción, mayor será el porcentaje de recuperación de los materiales solubles en lípidos, en este caso, hidratos de carbono complejos. En términos de potencia de extracción, el disolvente preferente es un disolvente etanólico al 80% o superior. Sin embargo, cuando el coste es un factor, los extractos adecuados pueden obtenerse con un disolvente etanólico al 30% y, posiblemente, con un porcentaje inferior. Los extractos pueden obtenerse a partir de un hongo completo, pero es preferente el uso del micelio; la parte delgada, similar a una raíz del hongo que existe dentro del sustrato desde el cual crece el hongo. El micelio absorbe los nutrientes desde el sustrato mediante la secreción de enzimas que descomponen los nutrientes para su absorción. Por lo tanto, el micelio es una fuente más rica de ciertos materiales bioactivos de lo que es el cuerpo de la fruta del hongo. Los extractos pueden añadirse a las composiciones de la presente invención en forma líquida o sólida. Fungi Perfecti[®] distribuye extracto etanólico de Hypsizyugus ulmarius en forma líquida o en polvo.

30 Ejemplo 1

Tres muestras de extracto etanólico de Hypsizyugus ulmarius al 34% recibidas de Fungi Perfecti[®] se sometieron a un análisis de composición. La muestra 1 se recibió de Fungi Perfecti[®] en forma de polvo y no se trató adicionalmente. La muestra 2 se recibió en forma de polvo tras haber sido sometida a radiación gamma de 13-17 kiloGrays. Ambas muestras 1 y 2 se secaron a presión atmosférica a partir de un extracto etanólico al 34%, mediante tecnología Refractance Windows[™]. La muestra 3 se recibió de Fungi Perfecti[®] en forma líquida y posteriormente fue secada por los solicitantes en un polvo, en un evaporador rotatorio que opera a 40°C, durante cuatro horas. El secado se llevó a cabo a una presión negativa de aproximadamente 1 atmósfera para disminuir el punto de ebullición del disolvente y, por tanto, la temperatura necesaria para el secado. Las menores temperaturas de secado son preferentes para evitar los efectos destructivos de la exposición al elevado calor, concretamente, caramelizando los componentes de azúcar del extracto.

Usando HPLC-PAD, se realizaron mediciones de los mono y oligosacáridos libres. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a hidrólisis ácida con solución de ácido clorhídrico al 10% durante 2 horas a 100°C. La hidrólisis ácida libera todas las unidades de azúcar monómero de los oligo y polisacáridos. A continuación, se midió el contenido total de azúcar de las muestras. Los resultados se muestran en la tabla 1.

45 Tabla 1 – Composición de sacáridos de los extractos de Hypsizyugus ulmarius de Fungi Perfecti[®]

Muestra	% de galactosa	% de glucosa	% de oligosacáridos
Antes de la hidrólisis			
1	12	18	18
2	11	18	18
3	7	15	19

(Cont.)

Después de la hidrólisis			
1	12	58	--
2	12	57	--
3	10	56	--

La muestra 1 se analizó adicionalmente para determinar el contenido de proteínas. El análisis se llevó a cabo antes y después de la hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 6N durante 16 horas a 110°C. La Tabla 2 muestra los resultados.

5

Tabla 2 - Composición proteica del extracto de *Hypsizygos ulmarius* de Fungi Perfecti®

Muestra	% de aminoácido	% total de aminoácido	% de proteína
1	2	10	8

La Tabla 3 descompone y resume adicionalmente los datos de las Tablas 1 y 2. Tal como se muestra, las muestras 1 y 2 tienen el mismo perfil de sacáridos. La muestra 3 es similar a las muestras 1 y 2, pero tiene un menor porcentaje de galactosa libre y glucosa libre.

10

Tabla 3 - Composición de sacáridos, proteínas de los extractos de *Hypsizygos ulmarius* de Fungi perfecti®

Componentes		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
		Secada mediante ventana de refractancia, no irradiada	Secada mediante ventana de refractancia, irradiada	Secada mediante evaporador rotatorio, no irradiada
% galactosa	total	12	12	10
	libre	12	12	7
% glucosa	total	58	58	56
	libre	18	18	15
	Oligosac.	18	18	19
	Glicanos, proteogli.	22	22	22
% aminoácidos		2		
% proteínas		8		
% agua		3		
% no identificado		17		

Aunque la única diferencia entre las muestras de ensayo es el procedimiento de secado y el uso de radiación gamma, se observan diferencias en los perfiles de sacáridos. Las muestras 1 y 2, secadas mediante ventana de refractancia, tiene un total del 12% de galactosa, toda ella libre, mientras que la muestra secada en el evaporador rotatorio tiene sólo el 10% de galactosa total, de la cual sólo el 7% es libre. De manera similar, las muestras 1 y 2 tienen un 58% de glucosa total, de los cuales el 18% está libre. Esto se compara con el 56% de glucosa total de la muestra 3, de la cual el 15% es libre. Las muestras 1 y 2 tienen perfiles idénticos de galactosa y glucosa, lo que implica que la irradiación gamma no tuvo efecto sobre el porcentaje de esas especies.

15

Ejemplo 2Efecto anti-quimiotáctico sobre los neutrófilos de extracto de *Hypsizygus ulmarius* hacia LTB4

Se ensayaron tres muestras de ensayo, idénticas a las muestras en polvo 1, 2 y 3 en el Ejemplo 1, para determinar su capacidad para inhibir la quimiotaxis de los neutrófilos hacia el leucotrieno B4. El ensayo está diseñado para evaluar la capacidad de un material para inhibir la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) hacia un agente quimiotáctico conocido, LTB4. La sangre venosa periférica heparinizada (20-30 ml) se obtuvo de donantes humanos sanos (que habían recibido instrucciones de abstenerse de la ingesta de cafeína durante las 12 horas anteriores), se distribuyó en capas sobre un gradiente de densidad (medio mono-poli de resolución, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) y se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos. La fracción rica en PMN se retiró y los glóbulos rojos de la sangre (RBC) se lisaron con solución salina hipotónica. Los PMN se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hank (HBSS) y, a continuación, se resuspendieron en 5,0 ml de HBSS con iones suplementados con 0,4% de albúmina sérica bovina (Sigma). La concentración de células se ajustó a 10×10^6 PMN/ml. Los PMNs recogidos tenían una pureza superior al 95% y una viabilidad del 98%, según se evaluó mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano.

El ensayo se realizó usando el aparato de cámara de Boyden con cámaras de pozos ciegos provistas con filtros de tamaño de poro de 5 μ m (Millipore). El aparato consiste en dos cámaras verticales separadas por un filtro que contiene poros de un tamaño elegido de manera que los orificios sean suficientemente grandes para que las células se arrastren activamente a través de los mismos, pero no tan grandes para que las células puedan caer físicamente a través de los mismos a la cámara inferior. A continuación, los PMNs se pre-incubaron con las muestras de hongos a concentraciones del 0,1% y del 1% en base al peso por volumen. Una suspensión de células PMN de 200 μ l se dispuso en capas sobre la parte superior del filtro, y se añadieron 100 μ l de factores quimiotácticos al compartimento inferior. El quimioatrayente usado en el presente experimento era 0,125 nM de LTB4. Tras una incubación a 37°C durante 90 minutos, bajo una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, los filtros se fijaron con propanol y se tiñeron con hematoxilina y eosina. La respuesta quimiotáctica de los PMN se determinó por la distancia a la parte delantera y el número de células que migraron a la parte delantera. La distancia a la parte delantera se determinó con un aumento de 400X por la distancia a lo largo de la cual migraron la mayoría de las células a través del filtro. Los resultados se expresaron como el número promedio de células por campo de alta potencia en la parte frontal (migratoria) (PMN/HPF). En este ensayo, se usó un 0,5% de cafeína como control positivo. También se usó un control negativo, sin agente anti-quimiotáctico. Los resultados, mostrados en la Tabla 4, son el porcentaje de reducción en la actividad quimiotáctica en comparación con el control negativo.

Tabla 4 - Porcentaje de reducción en la actividad quimiotáctica en comparación con el control negativo

Concentración (p/v)	Control positivo (cafeína)	Muestra 1, secada mediante ventana de refractancia, no irradiada	Muestra 2, secada mediante ventana de refractancia, irradiada	Muestra 3, secada mediante evaporador rotatorio, no irradiada
0,1%		no significativo	no significativo	42%
0,5%	96%			
1,0%		39%	no significativo	48%

El extracto etanólico de *Hypsizygus ulmarius*, secado en el evaporador rotatorio, muestra actividad anti-quimiotáctica significativa en los neutrófilos hacia el LTB4. Hay presente una actividad significativa en ambas concentraciones. De esta manera, a concentraciones de al menos el 0,1% (p/v), se establece una actividad anti-quimiotáctica significativa del extracto etanólico de *Hypsizygus ulmarius* al 34%. Los rendimientos de los extractos etanólicos de *Hypsizygus ulmarius* secados mediante ventana de refractancia fueron diferentes. La muestra no irradiada no era eficaz a una concentración del 0,1%, pero mostró una actividad significativa (39%) a una concentración del 1% (p/v) (aunque con una menor actividad que la muestra secada mediante evaporador rotatorio). La muestra irradiada no mostró actividad anti-quimiotáctica significativa a ninguna de las concentraciones. Puede concluirse que el procedimiento de secado Refractance Windows™ disminuye la actividad anti-quimiotáctica del extracto de *Hypsizygus ulmarius* en comparación con el secado mediante evaporador rotatorio descrito en la presente memoria. También puede concluirse que la irradiación gamma disminuye fuertemente la actividad anti-quimiotáctica del extracto de *Hypsizygus ulmarius*, independientemente del procedimiento de secado usado. En base a estos resultados, el extracto de *Hypsizygus ulmarius* útil en la presente invención no debería ser irradiado con rayos gamma de manera que se pierda toda la actividad anti-quimiotáctica. Además, un extracto en polvo preferente de *Hypsizygus ulmarius* se seca en un evaporador rotativo, aunque las muestras preparadas mediante ventanas de refractancia pueden ser usadas también con eficacia.

Ejemplo 3Efecto anti-quimiotáctico de los neutrófilos de extracto de *Hypsizygos ulmarius* hacia LTB4

En otro momento, se realizó un ensayo idéntico al descrito en el Ejemplo 2 sobre muestras de extracto etanólico de *Hypsizygos ulmarius* al 34% (de Fungi Perfecti), en solución a concentraciones del 0,1% y el 1,0%, volumen/volumen (en contraste con el peso/volumen usado anteriormente). Los resultados fueron dramáticamente diferentes. No se observó efecto anti-quimiotáctico a ninguna concentración.

Ejemplo 4Efecto anti-quimiotáctico en los neutrófilos de tres extractos de hongos hacia LTB4

Tres extractos etanólicos de hongos de Fungi perfecti® se ensayaron para determinar su capacidad para inhibir la quimiotaxis de los neutrófilos hacia el leucotrieno B4. Las muestras ensayadas eran extractos etanólicos de *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma tsugae* e *Hypsizygos ulmarius*. La muestra de ensayo de extracto de *Hypsizygos ulmarius* era equivalente a la muestra 3 en los Ejemplos 1 y 2 anteriores (34% de etanol y secada en un evaporador rotatorio, no irradiada con rayos gamma). Las muestras de *Fomitopsis* y *Ganoderma* se recibieron de Fungi perfecti® en forma líquida y se secaron en un evaporador rotatorio en la manera descrita anteriormente. El ensayo se realizó tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se encontró que los extractos de *Hypsizygos ulmarius* y *Fomitopsis officinalis* exhiben actividad anti-quimiotáctica significativa. En este ensayo, el porcentaje de reducción en la quimiotaxis debido al extracto de *Hypsizygos ulmarius* al 0,1% (p/v) no fue significativamente diferente del control negativo. El extracto de *Ganoderma tsugae* no proporcionó una reducción estadísticamente significativa de la quimiotaxis de PMN. En este ensayo, la cafeína al 0,1%, el control positivo, inhibió la quimiotaxis de 0,125 nM de LTB4 en un 93%. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5 - Porcentaje de reducción en la actividad quimiotáctica en comparación con el control negativo

Concentración (p/v)	Control positivo (cafeína)	Muestra 1, <i>Fomitopsis officinalis</i>	Muestra 2, <i>Ganoderma tsugae</i>	Muestra 3, <i>Hypsizygos ulmarius</i>
0,1%	93%	41%	no significativo	no significativo
1,0%		93%	no significativo	72%

Los resultados de los Ejemplos 2, 3 y 4 (Tablas 4 y 5) demuestran el efecto anti-quimiotáctico del extracto de *Hypsizygos ulmarius* en las concentraciones mostradas. En los Ejemplos 2 y 4, el porcentaje de reducción en la quimiotaxis mediada por LTB4 es una comparación con el rendimiento de la muestra de control negativo, pero depende también de las condiciones de ensayo, por ejemplo, la concentración de neutrófilos usada en el ensayo, la cantidad de LTB4 usada para atraer los neutrófilos, las condiciones ambientales, etc. Por esta razón, las cifras de reducción porcentual sólo son significativas cuando se comparan entre sí en el mismo ensayo. De manera razonable, se espera que las concentraciones del extracto de *Hypsizygos ulmarius* superiores al 1% (p/v) proporcionarán una mayor actividad anti-quimiotáctica. Pueden esperarse mayores reducciones en la quimiotaxis de neutrófilos mediada por LTB4 hasta concentraciones de al menos el 20% (p/v) antes de alcanzar una efectividad del 100%.

Ejemplo 5Efecto de tres extractos de hongos sobre la adhesión de neutrófilos mediada por IL-1 β

Tres muestras idénticas a las del ejemplo 4 se ensayaron para determinar su capacidad para inhibir la adhesión endotelial de los neutrófilos mediante una interferencia con los efectos de IL-1 β . Estas muestras se ensayaron a concentraciones finales del 0,1% y 1% (p/v). La adhesión de neutrófilos se inhibió, de manera dependiente de la dosis, con todas las muestras analizadas. La adhesión de los PMN a las células microvasculares dérmicas humanas es una etapa necesaria en el reclutamiento de leucocitos en el sitio de la infección o irritación y se modeló para este ensayo de la siguiente manera. Se recogió sangre venosa periférica heparinizada (20 -30 ml) de donantes humanos sanos (que recibieron instrucciones de abstenerse de la ingesta de cafeína durante las 12 horas anteriores), se dispuso en capas sobre un gradiente de densidad (medio de resolución mono-poli, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) y se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos. La fracción rica en PMN se retiró y los RBC se lisaron con solución salina hipotónica. Los PMN se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hank (HBSS) y, a continuación, se resuspendieron en 5,0 ml de HBSS con iones suplementado con 0,4% de albúmina sérica bovina (Sigma). La concentración de células se ajustó a 10 X 10⁶ PMN/ml. Los PMNs acumulados tenían una pureza superior al 95% y una viabilidad del 98% según se evaluó mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano.

Se obtuvieron células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC) de Clonetics Corp (MD) y se mantuvieron según las especificaciones hasta la confluencia. Los PMN se incubaron durante 30 minutos con el material de ensayo antes de ser colocados en las células endoteliales. En experimentos preliminares, se determinaron las concentraciones óptimas de los agentes estimulantes (IL-1 β , 10U/ml y TPA, 5ng/ml). Tras la incubación (30 minutos) con el material de ensayo más tetradecanoil forbol acetato (TPA, 5 ng/ml) o con material de ensayo solo, con TPA solo o vehículo, los PMN (350.000/pocillo) se añadieron a los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos en los que se había permitido que las células endoteliales llegaran a la confluencia. Las células endoteliales habían sido pre-incubadas con IL-1 β (10 U/ml) durante 60 minutos a 37°C en 5% de CO₂. Después de que los dos tipos de células habían estado en contacto durante dos horas, se retiró el sobrenadante, las células restantes se aclararon con cuidado, y se añadieron 100 μ l de 0,25% de tinte rosa de bengala (CIE) en PBS durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Las células no adherentes se eliminaron mediante dos lavados posteriores (Medio 199 con HEPES 25 mM y suero bovino fetal al 10%). El tinte incorporado en las células fue liberado mediante la adición de 200 μ l de etanol: PBS (1:1). Después de 30-45 minutos, los pocillos se leyeron en un lector ELISA (Bio-Tek Instruments Inc, Winooslei, Vt, EE.UU.) a 570 nm. El nivel de adhesión se proporcionó como una lectura de densidad óptica media (DO) a DO₅₇₀ para los pocillos que contenían células endoteliales más PMN menos la media DO₅₇₀ de los pocillos que contenían solo células endoteliales.

Los resultados de este ensayo (véase la Tabla 6) indican que las tres muestras de hongos poseen propiedades anti-adhesivas significativas, dependientes de la dosis. Puede apreciarse que el extracto de *Ganoderma tsugae* es menos activo que los otros dos extractos de hongos. En este ensayo, 1% de cafeína (control positivo), reduce la adherencia de PMN en un 64%. De esta manera, a concentraciones de al menos el 0,1% (p/v), se establece una actividad anti-adherencia significativa del extracto etanólico de *Hypsizygos ulmarius* al 34%, mientras que a concentraciones de al menos el 1% (p/v) de *Hypsizygos ulmarius* fue tan eficaz como el control de cafeína (63%). Aquí de nuevo, es posible que las cifras porcentuales de reducción sólo sean significativas cuando se comparan con otras cifras dentro del mismo ensayo. Sin embargo, la tendencia en la Tabla 6 indica que las concentraciones al menos tan altas como el 10% (p/v) aumentarían la eficacia anti-adherencia de los tres extractos ensayados.

Tabla 6 - Porcentaje de reducción en la actividad de adhesión en comparación con el control negativo

Concentración (p/v)	Control positivo (cafeína)	Muestra 1, <i>Fomitopsis officinalis</i>	Muestra 2, <i>Ganoderma tsugae</i>	Muestra 3, <i>Hypsizygos ulmarius</i>
0,1%		34%	30%	35%
1,0%	64%	63%	50%	63%

Ejemplo 6

Efecto anti-quimiotáctico de los neutrófilos de algas y almidón de maíz hacia LTB4

Una solución de algas al 1%, disponible con el nombre comercial Polysea PF, suministrada por Frutarom Industries, Ltd, y almidón de maíz puro se ensayaron según el procedimiento descrito anteriormente para determinar la actividad anti-quimiotáctica de la quimiotaxis de neutrófilos mediada por LTB4. Las muestras se ensayaron a concentraciones del 0,1% y el 0,5%. La Polysea PF de Frutarom fue ensayada en forma líquida. La cafeína al 0,1% se usó como control positivo. También se usó un control negativo. Polysea PF tiene una actividad anti-quimiotáctica significativa, mientras que el almidón de maíz no tiene ninguna. El resultado del almidón de maíz demuestra que no todos los polisacáridos exhiben un comportamiento anti-quimiotáctico. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7 - Porcentaje de reducción de la actividad quimiotáctica en comparación con el control negativo

Concentración	Control positivo (cafeína)	Polysea PF	Almidón de maíz
0,1%		57%	sin actividad
0,5%	94%	84%	sin actividad

Los Ejemplos 1-6 demuestran varias cosas. En primer lugar, los procedimientos de pretratamiento pueden tener un efecto sobre la composición de extracto de *Hypsizygos ulmarius*. El efecto puede ser suficiente para alterar la capacidad antiinflamatoria del extracto.

En segundo lugar, en relación a la anti-quimiotaxis y la anti-adherencia, no todos los extractos de hongos se comportan de igual manera. Por lo tanto, no debería esperarse que los hongos taxonómicamente diferentes se comporten de la misma manera cuando se usan como tratamientos anti-inflamatorios.

En tercer lugar, el rendimiento anti-inflamatorio del extracto de *Hypsizygos ulmarius* es bastante sensible a su composición de carbohidratos. La composición de muchos extractos de hongos puede no parecer muy sofisticada y es, sobre todo, una colección de sacáridos. Sin embargo, se demostró que incluso una ligera diferencia en los perfiles de sacáridos altera las propiedades anti-inflamatorias del extracto de *Hypsizygos ulmarius*. También, el almidón de maíz puro, un polímero de la glucosa, no tenía ningún efecto anti-quimiotáctico o anti-adhesivo, sin embargo, se sabe que los β -glucanos (también polímeros de glucosa) manifiestan amplios efectos variables en el proceso inflamatorio. Puede suponerse, de manera razonable, que las propiedades inflamatorias de muchos, si no la mayoría, de los extractos de hongo, son sensibles a la exacta composición de sacáridos de los extractos. Esta sensibilidad de la actividad anti-inflamatoria de la composición de carbohidratos del extracto de *Hypsizygos ulmarius* se extiende incluso al disolvente usado en la obtención del extracto. En base a un conocimiento de la conducta de la solubilidad básica, se espera que los extractos acuosos de *Hypsizygos ulmarius* tendrán cierta actividad anti-inflamatoria, aunque la explotación comercial puede no merecer la pena. Sin embargo, los extractos etanólicos de concentraciones crecientes de disolvente se retiran del hongo, aumentando los hidratos de carbono más complejos. En general, los hidratos de carbono complejos imparten un mayor beneficio antiinflamatorio que los hidratos de carbono simples. Por lo tanto, cuando se formulan las composiciones según la presente invención, pueden tenerse en cuenta la concentración de extracto de *Hypsizygos ulmarius* en la composición y la concentración de disolvente etanólico usada para recoger el extracto.

Tal como se ha indicado, las propiedades inflamatorias de muchos, si no la mayoría, de los extractos de hongos, son sensibles a la composición de sacáridos exacta de los extractos. Por lo tanto, los resultados de los ejemplos anteriores demuestran que el comportamiento de un extracto de hongos no puede suponerse a partir del comportamiento de otro extracto. De esta manera, puede ser beneficioso tener un número de hongos diferentes en una única composición. La presencia de varios hongos en una única composición puede extender el espectro de cobertura o puede permitir un enfoque más específico de condiciones y potencias.

Cantidades efectivas

Los datos anti-quimiotácticos y anti-adherencia indican fuertemente que las concentraciones de *Hypsizygos ulmarius* en polvo, obtenidas a partir de un extracto etanólico al 34% según el procedimiento descrito anteriormente, al menos tan bajo como el 0,1% (p/v) y hasta aproximadamente el 20% (p/v), son "anti-inflamatorias eficaces". Los Ejemplos 1, 2 y 4-6 usan extractos de *Hypsizygos ulmarius* en forma de polvo. También es posible usar el extracto en forma líquida, como en el Ejemplo 3. Para un extracto etanólico al 34%, se ha determinado que la forma líquida usada a una concentración del 2,5% (v/v) es equivalente a la forma en polvo usada a una concentración del 0,1% (p/v). Esta relación se determinó simplemente secando completamente un extracto líquido y comparando el peso y los volúmenes antes y después. Por lo tanto, puede esperarse que un extracto etanólico líquido al 34% a concentraciones al menos tan bajas como el 2,5% (v/v) para sea anti-inflamatorio eficaz. De manera similar, una concentración del 25% (v/v) es equivalente a la forma en polvo usada a una concentración del 1,0% (p/v). Lo que el Ejemplo 3 mostró, es que las concentraciones del 1% (v/v) (o del 0,04% p/v) y menores no exhiben actividades anti-inflamatorias en los ensayos descritos. Por lo tanto, se observa un límite inferior de eficacia entre el 0,04% y el 0,1% (p/v) para el extracto etanólico al 34%. Además, los datos anti-quimiotácticos y anti-adherencia indican fuertemente que la actividad anti-inflamatoria de *Hypsizygos ulmarius* en polvo al 34%, obtenido según el procedimiento descrito anteriormente, continúa aumentando al menos hasta el 20% (p/v). Sin embargo, tal como se ha indicado, las composiciones antiinflamatorias eficaces pueden emplear extractos de *Hypsizygos ulmarius* obtenidos con niveles de disolvente etanólico diferentes del 34%. De hecho, puede emplearse cualquier nivel superior al 34% para preparar una composición según la presente invención. En general, los extractos obtenidos con concentraciones más altas de disolvente serán de una mejor calidad con respecto a la actividad anti-inflamatoria, según se describe en la presente memoria. Por lo tanto, el nivel de extracto etanólico usado en la composición anti-inflamatoria tópica dependerá de la concentración de etanol usada en la extracción. Se usa un extracto etanólico al 34% como un estándar y se define una "concentración equivalente al 34%" como la concentración de extracto etanólico que muestra el mismo comportamiento anti-inflamatorio que una concentración determinada de extracto etanólico al 34%. Por ejemplo, se espera que un extracto etanólico al 85% tenga una mayor actividad anti-inflamatoria que un extracto al 34% y, por lo tanto, debería requerir una concentración menor para conseguir el mismo efecto. Teniendo en cuenta esta definición, la expresión "concentración antiinflamatoria eficaz" o similares significa del 0,1% (p/v) a aproximadamente el 20% (p/v) de un extracto etanólico al 34% o una concentración equivalente al 34%. Una concentración equivalente de extracto de *Hypsizygos ulmarius* al 34% puede ser determinada por una persona con conocimientos en la materia, mediante una rutina de ensayo y error.

Si se incorporan en vehículos cosméticos que tienen un alto contenido de alcohol, debe tenerse cuidado de evitar la precipitación del extracto etanólico. Debería evitarse el procesamiento con calor elevado y radiación para evitar la degradación del extracto y la pérdida de la actividad anti-quimiotáctica y de anti-adherencia. Aparte de esas

restricciones, el extracto de *Hypsizygus* descrito en la presente memoria puede ser incorporado en cualquier vehículo cosmética o dermatológicamente aceptable destinado a la aplicación tópica. Dichos vehículos incluyen sólidos, líquidos, cremas, lociones, emulsiones, geles, sueros, pomadas, cataplasmas, polvos, barras, etc. Las composiciones pueden ser envasadas en cualquier tipo de envase cosmético y dermatológico y material de envase que no reaccione adversamente con la composición. Puede ser ventajoso envasar las composiciones de la presente invención en envases opacos o a prueba de radiación para asegurar la actividad de los ingredientes activos. Las composiciones pueden ser administradas por vía tópica mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo toallita, pulverizador de bomba, pulverizador de aerosol, bomba de loción, tubo de compresión, barra de formación de espuma, etc.

Otros agentes anti- y pro-inflamatorios

La composición de la presente divulgación puede comprender agentes anti-inflamatorios distintos del extracto de *Hypsizygus ulmarius*. Uno o más de estos agentes pueden trabajar influyendo en la quimiotaxis mediada por LTB4 o la adhesión mediada por IL-1 β . Esto puede ser preferente si no se desean otros efectos anti-inflamatorios o si se desea manipular adicionalmente el porcentaje de reducción de la quimiotaxis mediada por LTB4 o la adhesión mediada por IL-1 β . De manera alternativa, puede ser deseable usar agentes anti-inflamatorios que tienen una actividad diferente de la del extracto de *Hypsizygus ulmarius*, proporcionando, de esta manera, un espectro de tratamiento anti-inflamatorio más amplio. También es posible usar agentes que producen un efecto antiinflamatorio sinérgico con el extracto de *Hypsizygus ulmarius*. Los agentes antiinflamatorios adecuados pueden incluir cualquiera de los conocidos por una persona con conocimientos ordinarios en la materia, que sea eficaz cuando se usa por vía tópica. Estos incluyen otros extractos de hongos, bien de especies diferentes de *Hypsizygus ulmarius* o bien extractos de *Hypsizygus ulmarius* obtenidos mediante procedimientos de extracción diferentes del descrito en la presente memoria. Los ejemplos de hongos de los que se conoce o se ha informado que tienen propiedades anti-inflamatorias cuando se aplican por vía tópica incluyen *Fomitopsis officinalis* (conocido también como *Agaricon*), *Cordyceps sinensis*, *Inontus obliquus* (conocido también como *Chaga*), *Phellinus linetus* (conocido también como *Mesima*), *Piptoporus betulinus* (conocido también como *Birch Polypore*), *Agaricus blazei*, *Dictyophora indusiata* y *Auricularia auricular-judae*.

La composición de la presente divulgación puede comprender incluso agentes pro-inflamatorios. Los agentes proinflamatorios pueden ser usados para manipular el porcentaje de reducción de la quimiotaxis mediada por LTB4 o la adhesión mediada por IL-1 β causada por el extracto de *Hypsizygus ulmarius*. Por ejemplo, los agentes que son quimioatrayentes para los neutrófilos sanguíneos (pro-inflamatorios) podrían ser usados en conjunción con el extracto de *Hypsizygus ulmarius* para ajustar más finamente el número de neutrófilos reclutados a un sitio de inflamación. Los agentes pro-inflamatorios adecuados pueden incluir cualquiera de los conocidos por una persona con conocimientos ordinarios en la materia que sea eficaz cuando se usa por vía tópica. Esto incluye extractos de hongos. Un ejemplo de extracto de hongo sobre el que se ha informado que tiene propiedades pro-inflamatorias es el extracto obtenido con agua caliente de *Ganoderma lucidum* (conocido también como *Reishi*, *Ling-Zhi*). Los polisacáridos específicos presentes en el extracto obtenido con agua caliente de *Ganoderma lucidum* han demostrado ser un potente quimioatrayente para los neutrófilos y un inhibidor eficaz de la apoptosis de neutrófilos. (véase "Signaling Mechanisms Of Enhanced Neutrophil Phagocytosis And Chemotaxis By The Polysaccharide Purified From *Ganoderma Lucidum*", Hsu, et al. *British Journal of Pharmacology*, 2003, 139, p. 289-298). Cabe señalar que en otros lugares se ha informado que *Ganoderma lucidum* tiene propiedades anti-inflamatorias, incluso cuando se usa por vía tópica (véase, por ejemplo, *Botanicals: A Phytocosmetic Desk Reference*, Frank S. D'Amelio, Sr., 1999, p. 181, pero este estudio establece definitivamente el extracto obtenido con agua caliente como pro-inflamatorio a través de una quimiotaxis mejorada.

Los ejemplos siguientes demuestran que los beneficios anti-inflamatorios de *Hypsizygus ulmarius* pueden ser ajustados finamente (mejorados o mitigados) mediante la inclusión de extractos naturales de diversos tipos.

Ejemplo 7

Efecto anti-quimiotáctico sobre los neutrófilos de tres combinaciones de activos hacia LTB4

Se ensayaron tres combinaciones de ingredientes activos para determinar su capacidad para inhibir la quimiotaxis de neutrófilos hacia el LTB4. Las tres combinaciones incluían extracto de *Hypsizygus ulmarius*. Los componentes de las tres muestras se muestran en la Tabla 8. El control positivo en este estudio era cafeína a una concentración del 0,5%. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

50

Tabla 8

Componente	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Extracto líquido de <i>Hypsizygos ulmarius</i> al 34% (v/v)	2,5%	2,5%	2,5%
Extracto en polvo de <i>Cordyceps sinensis</i> al 7%	0,01%	0,01%	
Extracto en polvo de <i>Ganoderma lucidum</i> al 10%	0,01%	0,01%	
¹ Pronalen Piel Sensible 0,01%	0,01%		
² Crodarom jengibre especial 0,01%	0,01%		
³ Tetrahidrocurcuminoides	0,001%		

5 ¹ butilenglicol/agua/extracto de hoja de *Ocimum sanctum*/extracto de fruta de *silybum marianum*, disponible en Centerchem, Inc.

² butilenglicol/agua purificada/extracto de raíz de *zingiber officinale*/Polisorbato 20, disponible en Croda EE.UU.

³ extracto de raíz de *curcuma longa* (cúrcuma).

Tabla 9 - Porcentaje de reducción de la actividad quimiotáctica en comparación con el control negativo

Control positivo (cafeína)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
97%	80%	71%	59%

10 Ejemplo 8

Efecto anti-adhesión mediado por IL-1 β de tres combinaciones de ingredientes activos

Se ensayaron las mismas tres combinaciones de sustancias activas del ejemplo 7 para determinar su capacidad para inhibir la adhesión mediada por IL-1 β de los neutrófilos. El control positivo en este estudio era cafeína a una concentración del 1,0%. Los resultados eran los indicados a continuación.

15 Tabla 10 - Porcentaje de reducción en la actividad de adhesión en comparación con el control negativo

Control positivo (cafeína)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
47%	44%	no significativo	47%

Discusión de los Ejemplos 7 y 8

20 Con referencia a la Tabla 9, las tres combinaciones de ingredientes activos son eficaces en la reducción de la quimiotaxis de los neutrófilos hacia el LTB4. Sin embargo, la presencia de *Cordyceps sinensis* y *Ganoderma lucidum* en la muestra 2, parece proporcionar una mejor actividad anti-quimiotáctica que *Hypsizygos ulmarius*, por sí mismo. Al principio, esto puede parecer sorprendente, dado que se ha informado anteriormente que *Ganoderma lucidum* es pro-inflamatorio. Sin embargo, también se ha indicado anteriormente que el extracto obtenido con agua caliente de *Ganoderma lucidum* es un potente quimioatrayente para los neutrófilos. Por lo tanto, aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría, es posible que el extracto de *Ganoderma lucidum* en la cámara de Boyden esté compitiendo contra LTB4 para los neutrófilos. Si este es el caso, entonces un menor número de neutrófilos están migrando hacia LTB4 en la cámara de Boyden, no debido al antagonismo o la inhibición de LTB4, si no debido a que los neutrófilos fueron expuestos a un segundo quimioatrayente.

30 Con referencia a la Tabla 10, la presencia de *Cordyceps sinensis* y *Ganoderma lucidum* parece mitigar los efectos anti-adherencia proporcionados por *Hypsizygos ulmarius*. Una vez más, es posible que esta vez *Ganoderma lucidum* sea, tal como se ha informado recientemente, pro-inflamatorio, pro-adhesión.

Con respecto a los otros componentes de la muestra de ensayo 1, se ha informado acerca de que el extracto de hoja de *Ocimum sanctum* (albahaca santa) tiene muchas propiedades y generalmente se considera anti-inflamatorio. El extracto de *Silybum marianum* (cardo mariano) es considerado generalmente como anti-inflamatorio y el extracto de raíz de cúrcuma es considerado ampliamente como anti-inflamatorio. Se ha informado de que el jengibre tiene propiedades anti-inflamatorias o pro-inflamatorias, dependiendo quizás del procedimiento de uso. Tiene muchos usos medicinales. En cierto sentido, se considera pro-inflamatorio, conocido por tener efectos vasodilatadores que aumentan el flujo sanguíneo y producen sensación de calor, cuando se aplica tópicamente. De manera alternativa, se considera anti-inflamatorio, cuando se usa tópicamente para aliviar el dolor de la artritis. También se ha informado de que estimula los folículos pilosos cuando se usa por vía tópica.

De esta manera, dependiendo de la cantidad relativa de agentes anti-inflamatorios y pro-inflamatorios empleada, una composición que comprende extracto de *Hypsizygos ulmarius* puede ser fuertemente anti-inflamatoria, fuertemente pro-inflamatoria o moderadamente o bien débilmente anti-inflamatoria o pro-inflamatoria. En cualquier caso, la presente invención sólo requiere que el extracto de *Hypsizygos ulmarius* sea responsable de al menos alguna actividad anti-inflamatoria en el uso de la composición. En otras palabras, es posible que otros agentes en la composición no mitiguen completamente la actividad anti-inflamatoria del extracto de *Hypsizygos ulmarius*. Por lo tanto, las composiciones tópicas preferidas de extracto de *Hypsizygos ulmarius* son, en general, antiinflamatorias.

Una amplia gama de materiales cosmética y farmacéuticamente aceptables pueden ser usados ventajosamente para conservar o alterar las propiedades físicas de la composición con el fin de crear para el usuario una experiencia sensorial única y placentera. Por ejemplo, sin apartarse del espíritu de la invención, puede incluirse una cantidad eficaz de uno o más de entre los elementos siguientes: abrasivos, absorbentes, agentes antiaglomerantes, agentes antiespumantes, agentes antifúngicos, agentes antimicrobianos, antioxidantes, aglutinantes, biocidas, tampones, agentes de carga, colorantes, inhibidores de corrosión, desodorantes, formadores de película, fragancia, humectantes, opacificantes, agentes oxidantes, ajustadores de pH, plastificantes, conservantes, propelentes, agentes reductores, modificadores de deslizamiento, disolventes, estabilizadores, agentes tensoactivos, agentes controladores de la viscosidad. Además, pueden usarse una amplia gama de materiales y sustancias cosméticamente activas y farmacéuticamente aceptables para proporcionar un beneficio a la piel. Estos incluyen una cantidad eficaz de uno o más de entre los elementos siguientes: abrasivos, absorbentes, agentes antiacné, agentes anti-envejecimiento, agentes antifúngicos, antiinflamatorios, agentes antimicrobianos, antioxidantes, antitranspirantes, astringentes, biocidas, exfoliantes químicos, productos de limpieza, desodorantes, agentes de depilación, agentes depiladores, analgésicos externos, humectantes, desmaquillantes, agentes blanqueadores de la piel, agentes acondicionadores de la piel, protectores de la piel, protectores solares, agentes de bronceado y absorbentes de UV. Casi cualquier agente cosmético, dermatológico o farmacéutico adecuado para su uso tópico, se encuentra dentro del alcance de la presente invención, siendo el único requisito que la composición global debe funcionar efectivamente como agentes anti-quimiotácticos y anti-adhesión para LTB4.

Las afecciones inflamatorias de la piel o afecciones que tienen un componente inflamatorio, que pueden ser tratadas con las composiciones según la presente invención incluyen: acné, queratosis actínica, angioma, pie de atleta, prurito acuagénico, dermatitis atópica, calvicie, carcinoma de células basales, úlceras de decúbito, enfermedad de Behçet, blefaritis, furúnculo, enfermedad de Bowen, penfigoide bulloso, llagas bucales, ántrax, celulitis, acné clórico, dermatitis crónica de manos y pies, dishidrosis, herpes labial, dermatitis de contacto, erupción progresiva, dermatitis Dermatitis herpetiforme, dermatofibroma, eczema, epidermolisis bullosa, erisipela, eritrodermia, ampollas por fricción, verrugas genitales, hidradenitis supurativa, urticaria, hiperhidrosis, ictiosis, impétigo, tiña inguinal, sarcoma de Kaposi, queloides, queratoacantoma, queratosis pilar, infección por piojos, liquen plano, liquen simple crónico, lipoma, linfadenitis, melanoma maligno, melasma, miliaria, molusco contagioso, dermatitis numular, enfermedad de Paget del pezón, pediculosis, pénfigo, dermatitis perioral, fotoalergia, fotosensibilidad, pitiriasis rosada, pitiriasis rubra pilaris, psoriasis, enfermedad de Raynaud, tiña, rosácea, sarna, esclerodermia, quiste sebáceo, queratosis seborreica, dermatitis seborreica, herpes zóster, cáncer de piel, papilomas cutáneos, varículas, carcinoma de células escamosas, dermatitis por estasis, picadura de garrapata, tiña de la barba, tiña del cuero cabelludo, tinea corporal, tiña inguinal, tiña del pie, tiña de las uñas, tiña versicolor, tiña, tungiasis, vitiligo y verrugas

Las composiciones según la presente invención son adecuadas para su uso por vía tópica y son eficaces cuando se usan por vía tópica. Debido a que la piel está casi siempre sometida a un ataque desde el entorno, los signos de envejecimiento debidos a inflamación persistente se abordan mejor mediante una aplicación periódica a largo plazo. Por ejemplo, para prevenir, mitigar o revertir los signos del envejecimiento debidos a inflamación persistente, la piel debería ser tratada al menos tres veces por semana, preferentemente una vez al día, más preferentemente, dos veces al día. Preferentemente, en un día determinado, se administra un tratamiento antes de una exposición a los agentes inflamatorios de la piel más duros. Para la mayoría de las personas, esto será poco después de dormir, tiempo durante el cual la piel es sometida a menos ataques desde factores externos. Para la mayoría de las personas, esto puede ser por la mañana, antes de salir de casa. Tratando la piel antes de la exposición a los agentes inflamatorios, el proceso inflamatorio puede ser interrumpido antes de que progrese significativamente. También debería ser ventajoso aplicar una composición según la presente invención poco antes de dormir. Mientras el cuerpo está en reposo, recibe menos

- ataques desde factores externos y es más capaz de realizar reparaciones a la piel. Por lo tanto, mediante la aplicación de una composición según la presente invención poco antes de dormir, se incrementarán los beneficios proporcionados por el extracto *Hypsizygus ulmarius*. En este caso, el tratamiento es usado para hacer frente a los efectos pro-inflamatorios debidos a la exposición a diversos factores ambientales. Las composiciones según la presente invención deberían aplicarse a las zonas de la piel en las que se desea la protección o en zonas de la piel donde ya son visibles los signos de envejecimiento. La composición puede ser extendida sobre la zona objetivo y puede permanecer sobre la piel durante un período sustancial de tiempo, por ejemplo, al menos cinco minutos, preferentemente hasta una hora, más preferentemente, más de una hora. El período de tiempo sustancial es necesario para permitir que los componentes activos del extracto penetren en las capas más externas de la piel. Debido a esto, debería evitarse enjuagar la piel con agua o alcohol, o limpiar la piel tratada durante el período de tiempo sustancial. Preferentemente, la cantidad de producto aplicado es de al menos aproximadamente 2,0 mg por centímetro cuadrado. Más preferentemente, la cantidad aplicada por cualquier individuo determinado se determinará mediante ensayo y error. Después de haber usado una composición según la presente invención, un usuario puede ajustar la cantidad de composición aplicada en base a los resultados observados.
- 5
- 10
- 15 El extracto etanólico de *Hypsizygus ulmarius* descrito en la presente memoria puede ser incorporado a cualquier vehículo dermatológicamente aceptable destinado para la aplicación tópica. Teniendo en cuenta la naturaleza alcohólica del extracto, dicha incorporación puede ser realizada mediante los procedimientos conocidos generalmente de la ciencia cosmética y dermatológica. Los procedimientos de esta clase se describen generalmente, por ejemplo, en Poucher's Perfumes, Cosmetics and Soaps (vol. 3, 9ª edición, Chapman & Hall) o Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª edición, Mack Publishing).
- 20

REIVINDICACIONES

1. Una composición anti-inflamatoria específica tópica que comprende al menos el 0,1% (p/v) de la composición total de extracto de *Hypsizygyus ulmarius*, en la que el disolvente usado para obtener el extracto es etanol al 34% o superior.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, en la que el efecto anti-inflamatorio incluye la inhibición de la quimiotaxis mediada por LTB₄.
3. Composición según la reivindicación 2, en la que el efecto anti-inflamatorio incluye la inhibición de la adhesión mediada por IL-1 β .
4. Composición según la reivindicación 1, en la que la concentración de extracto de *Hypsizygyus ulmarius* es de al menos el 1,0% (p/v) de la composición total.
- 10 5. Composición según la reivindicación 1, en la que la concentración de extracto de *Hypsizygyus ulmarius* es de al menos el 20,0% (p/v) de la composición total.
6. Composición según la reivindicación 1, en la que el extracto es un extracto de micelio.
7. Composición según la reivindicación 1, que comprende además extracto de *Ganoderma lucidum* y/o extracto de *Cordyceps sinensis*.
- 15 8. Composición según la reivindicación 7, que comprende además uno o más de entre extracto de hoja de *ocimum sanctum*, extracto de fruta de *silybum marianum*, extracto de raíz de jengibre y extracto de raíz de cúrcuma.
9. Composición según la reivindicación 8, en la que el extracto de *Hypsizygyus ulmarius* es un extracto etanólico al 34% a una concentración de al menos aproximadamente el 0,1% (p/v) de la composición total.
10. Composición según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de inflamación persistente de la piel.
- 20 11. Un procedimiento cosmético de tratamiento de los signos visibles de envejecimiento de la piel que comprende aplicar a una piel visiblemente envejecida una composición según la reivindicación 1.
12. Procedimiento cosmético según la reivindicación 11, en el que un objetivo del tratamiento es la prevención, mitigación o reversión de uno o más signos visibles de envejecimiento de la piel.
- 25 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que los signos visibles del envejecimiento incluyen arrugas en la piel.
14. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la composición es aplicada a la piel al menos tres veces por semana.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la composición es aplicada a la piel diariamente.
16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que la composición es aplicada a la piel al menos dos veces al día.
- 30 17. Procedimiento para su uso según la reivindicación 10, en el que la composición es aplicada a la piel poco después de despertarse.
18. Procedimiento para su uso según la reivindicación 10, en el que la composición es aplicada a la piel poco antes de dormir.
19. Composición según la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento de inflamación persistente de la piel.

35