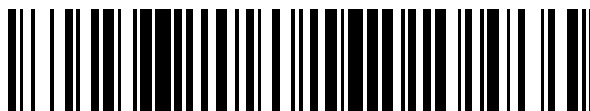


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 149**

51 Int. Cl.:

A61K 36/8994 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 17/04 (2006.01)

A61P 17/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012** **PCT/CN2012/086998**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014** **WO14094269**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012** **E 12890400 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017** **EP 2937095**

54 Título: **Extracto de salvado de adlai y uso del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
18.10.2017

73 Titular/es:

JOBEN BIO-MEDICAL CO., LTD. (100.0%)
9 Shennong E. Rd. Dehe Village
Changzhi, Pingtung 90846, TW

72 Inventor/es:

TSENG, HUANG-CHUNG;
HUANG, GIAO-ZHI y
CHIA, TUNG-AN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 638 149 T3

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

DESCRIPCIÓN

Extracto de salvado de adlai y uso del mismo

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 La invención se refiere a un extracto de salvado de adlai y usos del mismo; más particularmente, los usos para tratar una enfermedad de la piel y/o de tejido subcutáneo y rebajar la interleuquina (IL)-1 α , interleuquina-1 β , interleuquina-6, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleuquina-8, prostaglandina-2 (PGE2) y/o proteína C-reactiva (CRP).

2. Descripción de la técnica anterior

10 La piel es el órgano más grande en el cuerpo humano y es la principal barrera entre el cuerpo y el entorno, y es la primera línea de defensa frente a patógenos y tensiones o estimulaciones físicas y químicas. La piel no solamente proporciona la protección física y química, sino que también es un órgano inmunitario que puede causar eficazmente una respuesta inmunitaria pasiva y activa, protegiendo de este modo al cuerpo humano.

15 Del exterior al interior, la piel tiene una estructura de tres capas compuesta por la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo. La capa más externa, la epidermis, es responsable de las funciones de protección; la capa de la dermis en el interior de la capa de la epidermis es la parte más importante de la piel, y es responsable de soportar la epidermis y se entrelaza con diversas fibras para formar una red de soporte, y los vasos sanguíneos, nervios, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas y folículos pilosos están distribuidos en la capa de la dermis; la capa más interna de la piel es el tejido subcutáneo, lo que en general se refiere a la capa profunda de la dermis de los vertebrados, y en sentido estricto se refiere a los tejidos conjuntivos adiposos entre la dermis y el esqueleto y los músculos debajo de la dermis. El tejido subcutáneo formado principalmente por células de grasa no tiene un límite obvio con la dermis, y es responsable de bloquear y absorber la vibración y proporcionar una fuente de energía. El tejido subcutáneo es un sitio principal para el metabolismo de la grasa.

25 La piel y/o el tejido subcutáneo puede tener diversas enfermedades debido a algunos factores congénitos o adquiridos, dando como resultado incomodidad de los pacientes, y los cambios de aspecto causan cargas psicológicas en los pacientes. Sin embargo, los agentes para la piel y/o el tejido subcutáneo adoptados actualmente son esteroides o agentes ácidos, y grandes efectos secundarios pueden ser causados por el uso inapropiado, así que el uso de los agentes existentes no es un tratamiento apropiado.

30 En las enfermedades de la piel y/o el tejido subcutáneo, los daños causados por la radioterapia es uno de los tipos importantes, y la radioterapia siempre induce efectos secundarios tales como dermatitis por radiación, fatiga, neumonía y linfedema por radiación (McCormick et al., 1989, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 17: 1299-1302; Lingos et al., 1991, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 21: 355-360; Taylor et al., 1995, *Int J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 31: 753-764; Gorodetsky et al., 1999, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 45: 893-900; Erickson et al., 2001, *J. Natl. Cancer Inst*, 93: 96-111). Con el cáncer de mama como ejemplo, aproximadamente del 50% al 60% de los pacientes de cáncer de mama necesitan radioterapia después de la operación. Después de la resección por operación y quimioterapia sistémica, los efectos secundarios tales como caída del cabello, neutropenia, náuseas y vómitos siempre aparecen en los pacientes. Como resultado, los pacientes pueden evitar o rechazar el tratamiento por causa del miedo. La comunidad médica ha realizado algunas mejoras en el equipo y la tecnología de tratamiento para reducir los efectos secundarios de la radioterapia. En cuanto al eritema y la pigmentación cutáneas causadas por la radiación y algunos efectos secundarios graves tales como úlcera en una minoría de los pacientes, la comunidad médica siempre intenta usar algunos agentes de protección contra la radiación tales como Amifostina (Yuhas et al., 1980, *Cancer Clin. Trials.*, 3: 211-216). Sin embargo, los agentes casi no se usan en la práctica médica real debido a los fuertes efectos secundarios adjuntos, el efecto no obvio, o el alto precio. Un agente que tenga el efecto de protección contra radiación o refuerzo del efecto de la radiación y pueda reducir la dosis de radiación aún es necesario, para ser beneficioso para pacientes de cáncer que reciben la radioterapia.

45 Las semillas de adlai (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf), también llamado lágrimas de Job, son un componente de la medicina tradicional china (MTC) y se han usado durante mucho tiempo como agente anti-inflamatorio para tratar verrugas, piel agrietada, reumatismo y neuralgia (Li, S. C. *Pen-t'sao kangmu (Systematic Pharmacopoeia)*; China, 1596). Un estudio reciente mostró que el adlai descascarado (AD) modulaba la microbiota en el tracto intestinal de ratas (Chiang, W.; Cheng, C.; Chiang, M.; Chung, K. T. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 829-832). Además, los efectos anti-inflamatorio y antioxidante del adlai se elucidaron *in vitro* (Lee, M. Y.; Tsai, S. H.; Kuo, Y. H.; Chiang, W. *Food Sci. Biotechnol.* 2008, 17, 1265-1271; Kuo, C. C.; Shih, M. C.; Kuo, Y. H.; Chiang, W. J. *Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1564-1570). Se cuantificaron los contenidos de diversos potentes compuestos en semillas de adlai de diferentes orígenes (Wu, T. T.; Charles, A. L.; Huang, T. C. *Food Chem.* 2007, 104, 1509-1515). Varios antioxidantes fenólicos se aislaron de semillas de adlai, y se descubrió que los componentes bioactivos en las semillas de adlai eran estables durante el procesamiento (Hsu, H. Y.; Lin, B. F.; Lin, J. Y.; Kuo, C. C.; Chiang, W. J. *Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3763-3769). Se aislaron lignanos y compuestos fenólicos a partir de la cáscara de adlai (CA) en un aislamiento guiado por experimentación (Kuo, C. C.; Shih, M. C.; Kuo, Y. H.; Chiang, W. J. *Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1564-1570). Se aislaron flavanona y varios ácidos fenólicos de fracciones anti-inflamatorias de

semillas de adlai (Huang, D. W.; Kuo, Y. H.; Lin, F. Y.; Lin, Y. L.; Chiang, W. J. *Agric. Food Chem.* 2009, 57, 2259-2266; Huang, D. W., Chung, C. P.; Kuo, Y. H.; Lin, Y. L.; Chiang, W. J. *Agric. Food Chem.* 2009, 57, 10651-10657; Chen, H. J.; Chung, C. P.; Chiang, W.; Lin, Y. L. *Food Chem.* 2011, 126, 1741-1748). Se notificó que el alcohol fenólico en la testa de adlai (TA) posee actividad antialérgica (Chen, H. J.; Shih, C. K.; Hsu, H. Y.; Chiang, W. J. *Agric. Food Chem.* 2010, 58, 2596-2601). Además, el AD y salvado de adlai (SA) mostraron retardar la carcinogénesis a través de una ruta anti-inflamatoria (Shih, C. K.; Chiang, W.; Kuo, M. L. *Food Chem. Toxicol.* 2004, 42, 1339-1347; Li, S. C.; Chen, C. M.; Lin, S. H.; Chiang, W.; Shih, C. K. *J. Sci. Food Agric.* 2011, 91, 547-552), y el ácido ferúlico se consideró el componente activo en una investigación adicional (Chung, C. P.; Hsu, H. Y.; Huang, D. W.; Hsu, H. H.; Lin, J. T.; Shih, C. K.; Chiang, W. J. *Agric. Food Chem.* 2010, 58, 7616-7623).

El documento US 2004/101593 A1 desvela diferentes extractos de semillas de Coix usadas en combinación para el tratamiento de trastornos cutáneos.

HONG-JHANG CHEN ET AL: "Anti-inflammatory effects and chemical study of a flavonoid-enriched fraction from adlay bran", FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL, vol. 126, no. 4, 14 de diciembre de 2010 (14-12-2010), páginas 1741-1748, XP028134527 desvela que extractos en etanol de salvado de adlai suprimen citoquinas inflamatorias.

El documento CN 102 177978 A desvela que el aceite de semillas de Coix lacryma-jobi puede obtenerse mediante extracción de la semilla con alcohol etílico absoluto o con dióxido de carbono supercrítico.

El documento CN 1 502 680 A desvela la extracción de aceite de semilla de coix usando un proceso de extracción con CO₂ supercrítico.

El documento CN 101 189988 A extracción de aceite de adlai mediante agua o dióxido de carbono.

Aunque hay muchos usos de semillas de adlai notificados, aún están por desarrollar diversas aplicaciones de extracto de semillas de adlai.

Compendio de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar una composición para tratamientos cutáneos mejorados.

Este problema se resuelve mediante una composición de acuerdo con la reivindicación 1 y 8, respectivamente. Realizaciones ventajosas adicionales son el asunto de las reivindicaciones dependientes.

En la presente invención, el extracto de salvado de adlai tiene efectos en el tratamiento de una enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneo y en rebajar interleuquina-1 α , interleuquina-1 β , interleuquina-6, factor de necrosis tumoral- α , interleuquina-8, prostaglandina-2 y/o proteína C-reactiva. En particular, el extracto de salvado de adlai proporciona protección contra la radiación o mejora la eficacia de la radiación para reducir la dosis de radiación y además para beneficiar a pacientes de cáncer que reciben la radioterapia.

La presente invención proporciona una composición que comprende extracto de salvado de adlai, en donde el extracto de salvado de adlai comprende extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) y extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B), y la relación en peso del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:4.

Un método para tratar una enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneo en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de extracto de salvado de adlai y opcionalmente un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable en donde el extracto de salvado de adlai comprende extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) y extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B), y la relación en peso del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:4.

Un método para rebajar interleuquina-1 α , interleuquina-1 β , interleuquina-6, factor de necrosis tumoral- α , interleuquina-8, prostaglandina-2 y/o proteína C-reactiva en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de extracto de salvado de adlai y opcionalmente a transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde el extracto de salvado de adlai comprende extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) y extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B), y la relación en peso del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:4.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra el espectrograma de HPLC del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) de acuerdo con la invención.

La figura 2 ilustra el espectrograma de HPLC del extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de

adlai (B) de acuerdo con la invención.

La figura 3 ilustra el espectrograma de HPLC del extracto de salvado de adlai de acuerdo con la invención con la relación en peso de 1:4 del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B).

5 La figura 4 ilustra las secciones patológicas de tejido que muestran los efectos de las cápsulas de adlai a diferentes dosis de alimentación o el agente Sulfasil para tratar las lesiones de la piel causadas por radioterapia clínica en los daños del tejido de la piel de la pata de ratón causados por radioterapia. RT representa radioterapia; simulado representa sin radioterapia; y vehículo representa que ningún transportador o extracto de adlai está contenido.

10 La figura 5 ilustra los resultados de cambios de peso corporal de los animales con tumor que reciben la radioterapia y, al mismo tiempo, son alimentados con la cápsula de adlai de diferentes concentraciones o el agente Sulfasil para tratar las lesiones de la piel causadas por radioterapia clínica a través de un tubo. RT representa radioterapia; simulado representa sin radioterapia; y vehículo representa que ningún transportador o extracto de adlai está contenido.

15 La figura 6 ilustra los resultados de cambios del volumen tumoral de los animales con tumor que reciben la radioterapia y, al mismo tiempo, son alimentados con la cápsula de adlai de diferentes concentraciones o el agente Sulfasil para tratar las lesiones de la piel causadas por radioterapia clínica a través de un tubo. RT representa radioterapia; simulado representa sin radioterapia; y vehículo representa que ningún transportador o extracto de adlai está contenido.

20 La figura 7 ilustra los resultados de cambios de la concentración sérica de IL-1 α de los animales con tumor que reciben la radioterapia y al mismo tiempo, son alimentados con la cápsula de adlai de diferentes concentraciones o el agente Sulfasil para tratar las lesiones de la piel causadas por radioterapia clínica a través de un tubo. RT representa radioterapia; simulado representa sin radioterapia; y vehículo representa que ningún transportador o extracto de adlai está contenido.

25 La figura 8 ilustra los resultados de cambios de la concentración sérica de IL-1 β de los animales con tumor que reciben la radioterapia y, al mismo tiempo, son alimentados con la cápsula de adlai de diferentes concentraciones o el agente Sulfasil para tratar las lesiones de la piel causadas por radioterapia clínica a través de un tubo. RT representa radioterapia; simulado representa sin radioterapia; y vehículo representa que ningún transportador o extracto de adlai está contenido.

30 La figura 9 ilustra los resultados de cambios de la concentración sérica de IL-6 de los animales con tumor que reciben la radioterapia y, al mismo tiempo, son alimentados con la cápsula de adlai de diferentes concentraciones o el agente Sulfasil para tratar las lesiones de la piel causadas por radioterapia clínica a través de un tubo. RT representa radioterapia; simulado representa sin radioterapia; y vehículo representa que ningún transportador o extracto de adlai está contenido.

35 La figura 10 ilustra los resultados de cambios de la concentración sérica de TNF- α de los animales con tumor que reciben la radioterapia y, al mismo tiempo, son alimentados con la cápsula de adlai de diferentes concentraciones o el agente Sulfasil para tratar las lesiones de la piel causadas por radioterapia clínica a través de un tubo. RT representa radioterapia; simulado representa sin radioterapia; y vehículo representa que ningún transportador o extracto de adlai está contenido.

40 La figura 11 ilustra los resultados de cambios de la concentración sérica de IL-8 de los animales con tumor que reciben la radioterapia y, al mismo tiempo, son alimentados con la cápsula de adlai de diferentes concentraciones o el agente Sulfasil para tratar las lesiones de la piel causadas por radioterapia clínica a través de un tubo. RT representa radioterapia; simulado representa sin radioterapia; y vehículo representa que ningún transportador o extracto de adlai está contenido.

45 La figura 12 ilustra los resultados de cambios de la concentración sérica de PGE2 de los animales con tumor que reciben la radioterapia y, al mismo tiempo, son alimentados con la cápsula de adlai de diferentes concentraciones o el agente Sulfasil para tratar las lesiones de la piel causadas por radioterapia clínica a través de un tubo. RT representa radioterapia; simulado representa sin radioterapia; y vehículo representa que ningún transportador o extracto de adlai está contenido.

50 La figura 13 ilustra los resultados de cambios de la concentración sérica de IL-1 α de los animales con tumor que reciben la radioterapia y, al mismo tiempo, son alimentados con la cápsula de adlai de diferentes concentraciones o el agente Sulfasil para tratar las lesiones de la piel causadas por radioterapia clínica a través de un tubo. RT representa radioterapia; simulado representa sin radioterapia; y vehículo representa que ningún transportador o extracto de adlai está contenido.

55 La figura 14 ilustra las secciones patológicas de tejido que muestran los efectos de 25 diferentes dosis/combinaciones de alimentación sobre los daños del tejido de la piel de la pata de ratón causados por radioterapia. El eje horizontal y el eje vertical representan respectivamente la dosis/combinación de alimentación

(mg/kg) del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) y el extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B). Cada figura ilustra respectivamente las secciones patológicas de tejido de tejidos de piel de ratones que son alimentados con diferentes dosis a través de un tubo en el proceso de radioterapia del tumor.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende extracto de salvado de adlai, en donde el extracto de salvado de adlai comprende extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) y extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B), y la relación en peso del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:4.

La presente invención puede entenderse más fácilmente mediante la siguiente descripción detallada de diversas realizaciones de la invención, los ejemplos, y los dibujos químicos y las tablas con sus descripciones relevantes. Debe entenderse que, a menos que se indique específicamente otra cosa mediante las reivindicaciones, la invención no está limitada a métodos de preparación, transportadores o formulaciones específicas, o a modos particulares de formular el extracto de la invención en productos o composiciones concebidas para administración tópica, oral o parenteral, dado que como un experto en la materia es bien consciente, dichas cosas, por supuesto, pueden variar. Se entenderá también que la terminología usada en el presente documento es para fines de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitante.

Tal como se utilizan de acuerdo con la presente descripción, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tendrán el siguiente significado:

A menudo, los intervalos se expresan en el presente documento como de “aproximadamente” un valor particular y/o a “aproximadamente” otro valor particular. Cuando dicho intervalo se expresa, una realización incluye el intervalo desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. Análogamente, cuando se expresan valores como aproximaciones, mediante el uso de la palabra “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otra realización. Se entenderá además que los valores límite de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con como independientemente del otro valor límite. Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” se refiere al $\pm 10\%$.

“Opcional” u “opcionalmente” significa que el acontecimiento o circunstancia escrito posteriormente puede producirse o no, y que la descripción incluye casos donde dicho acontecimiento o circunstancia se produce y casos donde no lo hace. Por ejemplo, la frase “que opcionalmente comprende un agente” significa que el agente puede existir o no.

Debe observarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un,” “una” y “el” incluyen referencias en plural a menos que el contexto claramente indique lo contrario. De este modo, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular.

El término “sujeto” tal como se usa en el presente documento indica cualquier animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, primates no humanos, roedores, cobayas, conejos, ovejas, cerdos, cabras, vacas, caballos, perros y gatos.

La expresión “cantidad eficaz” de un ingrediente activo tal como se proporciona en el presente documento significa una cantidad suficiente del ingrediente para proporcionar la regulación deseada de una función deseada, tal como expresión génica, función proteica, o la inducción de un tipo particular de respuesta. Tal como se señalará a continuación, la cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la patología, las condiciones físicas, la edad, el sexo, la especie y el peso del sujeto, la identidad específica y la formulación de la composición, etc. Las pautas posológicas pueden ajustarse para inducir la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, varias dosis divididas pueden administrarse a diario o la dosis puede reducirse proporcionalmente tal como se indica mediante las exigencias de la situación terapéutica. De este modo, no es posible especificar una “cantidad eficaz” exacta. Sin embargo, una cantidad eficaz apropiada puede ser determinada por un experto en la materia usando solamente experimentación rutinaria.

El término “tratar” o “tratamiento”, tal como se usa en el presente documento, indica revertir, aliviar, inhibir el progreso de o mejorar el trastorno, la enfermedad o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno, enfermedad o afección.

El término “transportador” o “excipiente”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia, no en sí un agente terapéutico, usada como transportador y/o diluyente y/o adyuvante, o vehículo para la administración de un agente terapéutico a un sujeto o añadida a una formulación para mejorar sus propiedades de manipulación o almacenamiento o para permitir o facilitar la formación de una dosis unitaria de la composición en un artículo discreto tal como una cápsula o comprimido adecuado para administración oral. Transportadores o excipientes adecuados son bien conocidos por expertos en la materia de la fabricación de formulaciones farmacéuticas o productos alimentarios. Los transportadores o excipientes pueden incluir, a modo de ilustración y no

de limitación, tampones, diluyentes, disgregantes, agentes aglutinantes, adhesivos, agentes humectantes, polímeros, lubricantes, fluidificante, sustancias añadidas para enmascarar o contrarrestar un sabor u olor desagradable, aromas, colorantes, fragancias, y sustancias añadidas para mejorar el aspecto de la composición. Los transportadores o excipientes aceptables incluyen tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato, tampón bicarbonato, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, carbonato de magnesio, talco, gelatina, goma arábiga, alginato de sodio, pectina, dextrina, manitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, almidones, gelatina, materiales celulósicos (tales como ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos y ésteres de alquilo de celulosa), mantequilla de cacao en cera de bajo punto de fusión, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), dimetilsulfóxido (DMSO), cloruro de sodio u otras sales, liposomas, manitol, sorbitol, glicerol o polvo, polímeros (tales como polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, y polietilenglicoles), y otros materiales farmacéuticamente aceptables. El transportador no debe destruir la actividad farmacológica del agente terapéutico y debe ser no tóxico cuando se administra en dosis suficientes para administrar una cantidad terapéutica del agente.

La composición de acuerdo con la invención comprende el extracto de salvado de adlai. El salvado de adlai de acuerdo con la invención preferiblemente se obtiene de semillas de adlai descascaradas. La expresión “semillas de adlai descascaradas” tal como se usa en el presente documento se refiere a semillas de adlai sin cáscaras, testas, cubiertas, envueltas o vainas. La manera de retirar las cáscaras, cubiertas, envueltas o vainas de las semillas de adlai es bien conocida por expertos en esta materia. En general, las semillas de adlai descascaradas comprenden salvado y endosperma, y la manera de obtener el salvado de las semillas de adlai descascaradas es bien conocida por expertos en esta materia.

Las semillas de adlai mencionadas en esta invención no están particularmente limitadas. Preferiblemente, el adlai pertenece a la familia de *Gramineae*, la subfamilia *Panicoideae*, y expresión *Coix*, u orden *Poales*, familia *Poaceae*, y especie *Coix*. Más preferiblemente, el adlai es *Coix lachryma-jobi*, *Coix lachryma-jobi* L., *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf, *Coix agrestis* Lour., *Coix arundinacea* Lam., *Coix exaltata* Jacq., o *Coix lacryma* L.

El extracto de salvado de adlai de acuerdo con la invención comprende el extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) y el extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B).

La expresión “alcohol de C1 a C7”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a alcohol lineal o ramificado, sustituido o sin sustituir, mono- o poli-funcional, y saturado o insaturado; preferiblemente alcohol sin sustituir, mono-funcional y saturado. En una realización preferida de la invención, el alcohol de C1 a C7 se selecciona entre el grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, iso-butanol, sec-butanol, terc-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2,4-hexadieno-1-ol, 2-metil-ciclopentanol, ciclohexanol, 1-heptanol, 2-heptanol o alcohol cicloheptílico. Más preferiblemente, el alcohol de C1 a C7 es metanol o etanol; lo más preferiblemente, el alcohol de C1 a C7 es etanol. El alcohol de C1 a C7 puede usarse en solitario o en combinaciones.

El alcohol de C1 a C7, tal como se usa en el presente documento, es preferiblemente una solución alcohólica con una concentración de aproximadamente el 49% (v/v) a aproximadamente el 99,9% (v/v); más preferiblemente de aproximadamente el 75% (v/v) a aproximadamente el 99,9% (v/v); aún más preferiblemente de aproximadamente el 90% (v/v) a aproximadamente el 98,0% (v/v).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A)” se refiere a extracto obtenido extrayendo el salvado de adlai con el alcohol de C1 a C7. La manera de extraer una parte de una semilla con una solución es bien conocida por los expertos en esta materia. En una realización preferida de la invención, el salvado de adlai se empapa en la solución alcohólica para extracción; más preferiblemente, el salvado de adlai se empapa en la solución alcohólica y se somete a extracción por vibración ultrasónica.

La temperatura de extracción es preferiblemente de aproximadamente 10°C a aproximadamente 100°C; más preferiblemente de aproximadamente 15°C a aproximadamente 50°C; aún más preferiblemente de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C.

En una realización preferida de la invención, el extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) se prepara de acuerdo con un proceso que comprende:

- (a) proporcionar salvado de adlai;
- (b) cortar el salvado de adlai en trozos pequeños; y
- (c) extraer los trozos pequeños en la etapa (b) con el alcohol de C1 a C7 para obtener un extracto.

De acuerdo con el proceso de la invención, antes de la etapa (b), el salvado de adlai se seca preferiblemente.

En una realización preferida de la invención, la etapa (b) comprende además mezclar los trozos pequeños en polvo.

La manera de cortar y/o mezclar es bien conocida por los expertos en esta materia.

La relación (p/v) del salvado de adlai y la solución alcohólica no está específicamente restringida, y puede ser de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10; preferiblemente de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:8; y lo más preferiblemente de aproximadamente 1:5.

- 5 En una realización preferida de la invención, la etapa de extracción (c) puede repetirse, y el extracto se recoge mediante fusión.

Preferiblemente, el proceso comprende además (d) obtener una fracción líquida del extracto, y una fracción sólida se retira. La manera de retirar la fracción sólida para obtener la fracción líquida es bien conocida por los expertos en esta materia.

- 10 Preferiblemente, el proceso comprende además una etapa de condensación. La manera de condensación es bien conocida por los expertos en esta materia, tal como mediante un condensador a presión reducida.

- 15 El extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) de acuerdo con la presente invención se refiere a un extracto obtenido extrayendo salvado de adlai con fluido supercrítico de dióxido de carbono. El fluido supercrítico se refiere a un estado fluido homogéneo obtenido finalmente cuando las propiedades de gas y líquido se hacen similares a una temperatura mayor que la temperatura crítica y una presión mayor que la presión crítica. Similar al gas, el fluido supercrítico tiene compresibilidad, y similar al fluido, tiene la fluidez, y puede usarse para extracción; además, un equipo de extracción con fluido supercrítico comercial está disponible, por ejemplo, NATEX, SEPAREX, UHDE y TAIWAN SUPERCRITICAL TECHNOLOGY Co., Ltd. proporcionan equipos de extracción con fluido supercrítico comerciales, cuyas especificaciones están indicadas generalmente por la capacidad del tanque de extracción, tal como de 500 g a 2000 kg para selección, de modo que un equipo de extracción con fluido supercrítico adecuado pueda seleccionarse de acuerdo con los requisitos.

- 20 En una realización preferida de la invención, el extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) se extrae a una presión de aproximadamente 150 bares a aproximadamente 500 bares; más preferiblemente de aproximadamente 200 bares a aproximadamente 400 bares; aún más preferiblemente de aproximadamente 350 bares a aproximadamente 380 bares.

- 25 En una realización preferida de la invención, el extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) se extrae a una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 80°C; más preferiblemente de aproximadamente 40°C a aproximadamente 70°C; aún más preferiblemente de aproximadamente 50°C a aproximadamente 60°C.

- 30 En una realización preferida de la invención, el extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) se extrae con un flujo de fluido supercrítico de dióxido de carbono de aproximadamente 20 kg/h a aproximadamente 50 kg/h; más preferiblemente de aproximadamente 30 kg/h a aproximadamente 45 kg/h; aún más preferiblemente de aproximadamente 38 kg/h a aproximadamente 40 kg/h.

- 35 En una realización preferida de la invención, el tiempo de extracción para el extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) es de aproximadamente 40 minutos a aproximadamente 100 minutos; más preferiblemente de aproximadamente 50 minutos a aproximadamente 80 minutos.

- En una realización preferida de la invención, el extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) se extrae en existencia de un co-disolvente tal como de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 10% de etanol al 95%.

- 40 Preferiblemente, el extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono comprende además una etapa de condensación. La manera de condensación es bien conocida por los expertos en esta materia, tal como mediante un condensador a presión reducida.

- 45 De acuerdo con la invención, la relación en peso del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:4. En el intervalo, el efecto farmacéutico en el tratamiento de una enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneo es muy eficaz; preferiblemente, la relación es de aproximadamente 3:2 a aproximadamente 1:2; más preferiblemente, la relación es de aproximadamente 3:2, aproximadamente 3:1, aproximadamente 1:2 o aproximadamente 1:4.

- 50 En una realización preferida de la invención, el extracto de salvado de adlai se somete a un ensayo de cromatografía líquida de alta resolución. La muestra se prepara como una concentración de 1 g/ml usando acetona como disolvente y se filtra con un filtro de 0,45 µm. La muestra filtrada de veinte µl se analiza mediante HPLC de análisis de Hitachi®. La columna es columna C18 de fase inversa (250×4,6 mm d.i.; YMC Co., INC), y el detector es un detector de matriz de fotodiodos. La temperatura de la columna es de 40°C. Los cromatogramas se extraen a 280 nm. La fase móvil usa solución A: ácido acético al 5% en agua; solución B: ácido acético al 0,5% en agua/acetonitrilo al 100% (1:1, v/v). El programa de elución en gradiente se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	1,0	90	10
10	1,0	85	15
20	1,0	84	16
35	1,0	83	17
50	1,0	79	21
55	1,0	79	21

El espectrograma del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) se muestra en la figura 1; el espectrograma del extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) se muestra en la figura 2; y el espectrograma del extracto de salvado de adlai con la relación en peso de 1:4 del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) se muestra en la figura 3. Tal como se muestra en la figura 3, el espectrograma obtenido comprende picos a un tiempo de retención de aproximadamente 12,5 minutos a aproximadamente 13,5 minutos, de aproximadamente 14 minutos a aproximadamente 15,5 minutos, de aproximadamente 15,5 minutos a aproximadamente 16,5 minutos, de aproximadamente 21 minutos a aproximadamente 22,5 minutos, y de aproximadamente 32 minutos a aproximadamente 35 minutos.

La composición de acuerdo con la invención es preferiblemente una composición farmacéutica, composición alimentaria o una composición cosmética.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra preferiblemente por vía tópica o por vía sistémica mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin limitarse a, vías intramuscular, intradérmica, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, oral, mucosal o externa. La vía, formulación y programa de administración apropiados pueden ser determinadas por los expertos en la materia. En la presente invención, la composición farmacéutica puede formularse de diversas maneras, de acuerdo con la vía de administración correspondiente, tal como una solución líquida, una suspensión, una emulsión, un jarabe, un comprimido, una pastilla, una cápsula, una formulación de liberación sostenida, un polvo, un gránulo, una ampolla, una inyección, una infusión, un kit, una pomada, una loción, un linimento, una crema o una combinación de los mismos. Si fuera necesario, puede esterilizarse o mezclarse con cualquier transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable, muchos de los cuales son conocidos por un experto en la materia; véase el párrafo [0037], por ejemplo.

La vía externa, tal como se usa en el presente documento, es conocida también como administración local, incluye aunque sin limitarse a, administración por insuflación e inhalación. Los ejemplos de diversos tipos de preparación para administración local incluyen pomadas, lociones, cremas, geles, espumas, preparaciones para administración mediante parches transdérmicos, polvos, pulverizaciones, aerosoles, cápsulas o cartuchos para uso en un inhalador o insuflador o gotas (por ejemplo, gotas oculares o nasales), soluciones/suspensiones para nebulización, supositorios, pesarios, enemas de retención y comprimidos masticables o para chupar o gránulos o preparaciones en liposomas o en microencapsulación.

Las pomadas, cremas y geles, pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de un agente espesante y/o gelificante y/o disolventes adecuados. Dichas bases pueden por tanto, por ejemplo, incluir agua y/o un aceite tal como parafina líquida o un aceite vegetal tal como aceite de cacahuete o aceite de ricino, o un disolvente tal como polietilenglicol. Los agentes espesantes y agentes gelificantes que pueden usarse de acuerdo con la naturaleza de la base incluyen parafina blanda, estearato de aluminio, alcohol cetosteárilico, polietilenglicoles, grasa de lana, cera de abejas, carboxipolimetileno y derivados de celulosa, y/o monoestearato de glicerilo y/o agentes emulsionantes no iónicos.

Las lociones pueden formularse con una base acuosa u oleosa y, en general, también contendrán uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión o agentes espesantes.

Los polvos para aplicación externa pueden formarse con ayuda de cualquier base en polvo adecuada, por ejemplo, talco, lactosa o almidón. Pueden formularse gotas con una base acuosa o no acuosa que también comprende uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes, agentes de suspensión o conservantes.

Las composiciones para pulverización pueden formularse, por ejemplo, como soluciones o suspensiones acuosas o como aerosoles suministrados desde envases presurizados, tales como un inhalador de dosis medida, con el uso de

un propulsor licuado adecuado. Las composiciones en aerosol adecuadas para inhalación pueden ser una suspensión o una solución. La composición en aerosol puede contener opcionalmente excipientes de formulación adicionales bien conocidos en la técnica tales como tensioactivos, p. ej., ácido oleico o lecitina y codisolventes p. ej., etanol.

- 5 Las preparaciones tópicas pueden administrarse mediante una o más aplicaciones por día a la zona afectada; sobre las zonas de la piel, pueden usarse ventajosamente apósitos oclusivos. La administración continua o prolongada puede conseguirse mediante un sistema de depósito adhesivo.

10 La composición cosmética de acuerdo con la invención puede ser una formulación en fase acuosa que consiste esencialmente en agua; también puede comprender una mezcla de agua y de disolvente miscible en agua (miscibilidad en agua de más del 50% en peso a 25°C), por ejemplo monoalcoholes inferiores que contienen de 1 a 5 átomos de carbono tales como etanol o isopropanol, glicoles que contienen de 2 a 8 átomos de carbono, tales como propilenglicol, etilenglicol, 1,3-butilenglicol o dipropilenglicol, cetonas de C3-C4 y aldehídos de C2-C4 y glicerina. Dicha formulación acuosa preferiblemente está en forma de gel acuoso o formulación en hidrogel. La formulación en hidrogel comprende un agente espesante para espesar la solución líquida. Los ejemplos de los
15 agentes espesantes incluyen, aunque sin limitarse a, carbómeros, materiales de base de celulosa, gomas, algina, agar, pectinas, carragenina, gelatina, espesantes minerales o minerales modificados, polietilenglicol y polialcoholes, poliacrilamida y otros espesantes poliméricos. Se usan preferiblemente los agentes espesantes que dan la estabilidad y características de flujo óptimas de la composición.

20 La composición cosmética de acuerdo con la presente invención puede estar en una forma de formulación en emulsión o en crema. Puede contener tensioactivos emulsionantes. Estos tensioactivos pueden seleccionarse entre tensioactivos aniónicos y no iónicos. Puede hacerse referencia al documento "Encyclopedia of Chemical Technology, Kirk-Othmer", volumen 22, págs. 333-432, 3ª edición, 1979, Wiley, para la definición de las propiedades y funciones (emulsionantes) de los tensioactivos, en particular págs. 347-377 de dicha referencia, para los tensioactivos aniónicos y no iónicos.

25 Los tensioactivos usados preferiblemente en la composición cosmética de acuerdo con la invención se seleccionan entre: tensioactivos no iónicos: ácidos grasos, alcoholes grasos, alcoholes grasos polietoxilados o poliglicerolados tales como alcohol estearílico o cetil-estearílico polietoxilado, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de alquilglucosa, en particular ésteres grasos polioxietilenados de alquil C1-C6 glucosa, y mezclas de los mismos; tensioactivos aniónicos: ácidos grasos C16-C30 neutralizados con aminas, amoniaco acuoso o sales alcalinas, y
30 mezclas de los mismos. Se usan preferiblemente tensioactivos que hacen posible obtener una emulsión de aceite-en-agua o de cera-en-agua.

La composición cosmética de acuerdo con la invención puede comprender además una cantidad eficaz de un antioxidante fisiológicamente aceptable seleccionado entre el grupo que consiste en p-cresol butilado, éter monometílico de hidroquinona butilado y un tocoferol.

35 La composición cosmética de acuerdo con la invención puede comprender además un aminoácido natural o modificado, un compuesto de esteroide natural o modificado, colágeno natural o modificado, proteína de seda o proteína de soja.

40 La composición cosmética de acuerdo con la invención se formula preferiblemente para aplicación tópica a materiales de queratina tales como la piel, el cabello, las pestañas o las uñas. Pueden estar en cualquier forma de presentación usada normalmente para este tipo de aplicación, especialmente en forma de una solución acuosa u oleosa, una emulsión de aceite en agua de agua en aceite, una emulsión de silicona, una microemulsión o nanoemulsión, un gel acuoso u oleoso o un producto anhidro líquido, pastoso o sólido.

45 La composición cosmética de acuerdo con la invención puede ser más o menos fluida y puede tener el aspecto de una crema blanca o coloreada, una pomada, una leche, una loción, un suero, una pasta, una espuma o un gel. Puede aplicarse opcionalmente por vía tópica sobre la piel en forma de un aerosol, un parche o un polvo. También puede estar en forma sólida, por ejemplo, en forma de un palo. Pueden usarse como productos de cuidado y/o como productos de maquillaje para la piel. Como alternativa, puede formularse como champús o acondicionadores.

50 De forma conocida, la composición cosmética de acuerdo con la invención también puede contener aditivos y adyuvantes que son comunes en cosmética, tales como agentes gelificantes hidrófilos o lipófilos, conservantes, antioxidantes, disolventes, fragancias, cargas, pigmentos, absorbentes de olor y materiales colorantes.

55 El extracto de salvado de adlai puede añadirse a una composición alimentaria convencional (es decir, el alimento o bebida comestible o precursores de los mismos) en el proceso de fabricación de la composición alimentaria. Casi todas las composiciones alimentarias pueden suplementarse con el extracto de salvado de adlai de la invención. Las composiciones alimentarias que pueden suplementarse con el extracto de salvado de adlai de la invención incluyen, aunque sin limitarse a, dulces, productos de panadería, helados, productos lácteos, aperitivos dulces y de sabor, golosinas en barra, productos sustitutivos de una comida, comidas rápidas, sopas, pastas, fideos, alimentos enlatados, alimentos congelados, alimentos deshidratados, alimentos refrigerados, aceites y grasas, alimentos para bebés, o alimentos blandos aplicados en panes, o mezclas de los mismos.

La invención también proporciona un método para tratar una enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneo en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de extracto de salvado de adlai y opcionalmente un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde el extracto de salvado de adlai comprende extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) y extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B), y la relación en peso del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:4.

La invención también proporciona el uso de extracto de salvado de adlai en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneo, en donde el extracto de salvado de adlai comprende extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) y extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B), y la relación en peso del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:4.

La "enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneo" tal como se usa en el presente documento se refiere a una enfermedad que se produce en la piel y/o el tejido subcutáneo. En una realización preferida de la invención, la enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneo se selecciona entre el grupo que consiste en inflamación, daño del folículo piloso, atrofia de la piel, hematoma, quemadura, queilitis, piel seca, enrojecimiento, alopecia, hiperpigmentación, hipopigmentación, induración, fibrosis, reacción en el lugar de la inyección, cambio de extravasación, cambio en las uñas, fotosensibilidad, prurito, picazón, sarpullido, descamación, acné, acneiforme, dermatitis asociada con la radiación, eritema multiforme, reacción de la piel de la mano-el pie, ruptura de la piel, úlcera de decúbito, estrías, telangiectasia, ulceración y urticaria.

En una realización preferida de la invención, la enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneo es causada por la radiación. Preferiblemente, la radiación es radiación de la radioterapia para tratar un tumor. El tumor es preferiblemente un tumor de mama o un tumor de pulmón.

La invención proporciona además un método para rebajar interleuquina-1 α , interleuquina-1 β , interleuquina-6, factor de necrosis tumoral- α , interleuquina-8, prostaglandina-2 y/o proteína C-reactiva en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de extracto de salvado de adlai y opcionalmente un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde el extracto de salvado de adlai comprende extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) y extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B), y la relación en peso del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:4.

La invención también proporciona uso de extracto de salvado de adlai en la fabricación de un medicamento para rebajar interleuquina-1 α , interleuquina-1 β , interleuquina-6, factor de necrosis tumoral- α , interleuquina-8, prostaglandina-2 y/o proteína C-reactiva, en donde el extracto de salvado de adlai comprende extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) y extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B), y la relación en peso del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:4.

Los siguientes ejemplos se dan para fines de ilustración solamente y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Modelo animal

Fármacos y reactivos: las semillas de adlai (*C. lachrymajobi* L., Taichung Shuenyu no 4, TCS4) se adquieren de los granjeros en el condado de Taichung, Taiwán.

Extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A): la envuelta y la cubierta de la semilla de adlai se retiran usando un molino, y el salvado de adlai se muele en polvo, se sumerge en 3 recipientes de etanol al 95% (p/v) a 25°C, y se somete a extracción por vibración ultrasónica durante 24 horas. Los extractos de extracción de tres veces se combinan, y se condensan a presión reducida a 50°C, para obtener extracto en etanol de salvado de adlai.

Extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B): la envuelta y la cubierta de la semilla de adlai se retiran usando un molino, y el salvado de adlai se muele en polvo y se alimenta en un tanque interno de extracción de acero inoxidable, y a continuación el tanque interno se coloca en un tanque de extracción de equipo de extracción supercrítica. Las condiciones de extracción son: presión de extracción: 360 bares; temperatura de extracción: 55°C; flujo de dióxido de carbono: de 38 a 40 kg/h; co-disolvente: del 2% al 95% de etanol; tiempo de extracción: 60 min. El extracto se recoge, y se condensa mediante un condensador a presión reducida.

Relación en peso del extracto: La dosis de alimentación del extracto de salvado de adlai se selecciona para ser de 100 mg/kg y 100 μ l/día, y el volumen de alimentación en tubo es 100 μ l/ratón. El extracto de salvado de adlai usado en los experimentos se suspende en CMC (carboximetilcelulosa) al 0,5% a través de vibración ultrasónica y se alimenta a través de un tubo, y los ratones se sacrifican el 35º día. Los 25 tipos de dosis de alimentación diferentes se obtienen combinando la dosis de alimentación del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) que es

0, 100, 200, 300 and 400 mg/kg y la dosis de alimentación del extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) que es 0, 100, 200, 300, 400 mg/kg, y el volumen de alimentación en tubo es 100 µl/ratón/día.

Discusión de la actividad y mecanismo de extracción contra el efecto secundario de inflamación de la piel causada por radioterapia de un tumor animal: la cápsula de adlai es alimentada a los animales a través de un tubo (grupo de ensayo, extracto A: extracto B es 1:4), y se ensaya el efecto de diferentes dosis sobre el alivio del efecto secundario de inflamación de la piel causada por radioterapia. En el modelo animal, células de cáncer de mama de ratón (4T1, 1×10^6 células/ratón) se implantan en la pata de ratón BALB/c, cuando el diámetro del tumor es de aproximadamente 4 mm, diferentes dosis de muestras de ensayo se alimentan a través de un tubo, y dos días después, la radioterapia (irradiación 5 Gy cada día, cinco días en total) se inicia y el extracto de salvado de adlai se alimenta a través de un tubo cada día, hasta que el experimento ha terminado. En el proceso del experimento, el tamaño y el peso del tumor se miden y la sangre es muestreada cada cinco días. El agente Sulfasil para tratar las lesiones de la piel en radioterapia clínica actual se usa como el grupo de control. Después de que los ratones son sacrificados, se realizan secciones de tejido de la parte de radioterapia del tumor para examen patológico de tejido de la epidermis y el folículo piloso y determinar el daño de las células de la epidermis y los fibroblastos en el tejido de la epidermis adoptando el ensayo TUNEL, en combinación con patología, y detecta la expresión de moléculas relacionadas con la inflamación tales como NF-κB, COX-2, IL-1β y TNF-α usando inmunotinción. Los resultados de las secciones se muestran en la figura 4.

Los resultados del cambio de peso se muestran en la figura 5, las muestras de ensayo se administran a los animales con tumor cuando se administra radioterapia, y existe ninguna diferencia significativa en cambio de peso entre grupos; se puede saber a partir de la figura 6 que las muestras de ensayo son administradas a los animales con tumor cuando se administra radioterapia, el volumen tumoral se redujo significativamente, en comparación con el grupo de blanco, y no existe ninguna diferencia significativa entre los grupos con radioterapia administrada.

En otro aspecto, las cápsulas de adlai (grupo de ensayo, extracto A:extracto B es 1:4) de 200 y 400 mg/kg reducen significativamente la inflamación de la piel causada por radioterapia, y al mismo tiempo, inhiben la disminución de IL-1α (figura 7), IL-1β (figura 8), IL-6 (figura 9), TNF-α (figura 10), IL-8 (figura 11), PGE2 (figura 12) y CRP (figura 13) en suero causada por la radioterapia; una cápsula de adlai de 100 mg/kg simplemente tiene un efecto de inhibición significativo sobre algunos índices. Se puede saber a partir de los resultados que cápsulas de adlai de 200 y 400 mg/kg tienen un efecto significativo en la reducción de las lesiones en el tejido de la piel e inhibir los índices del factor inflamatorio in vivo del animal.

Alivio de las enfermedades de la piel y/o subcutáneas causadas por radioterapia: Las etapas se realizan como se ha descrito en la evaluación de seguridad, excepto que la graduación de toxicidad de la respuesta de la epidermis in vivo causada por radioterapia de tumores es evaluada cada siete días en el proceso del estudio. En el método de graduación de toxicidad de respuesta de la epidermis in vivo, se adopta el sistema CTCAE (criterios terminológicos comunes para acontecimientos adversos v3.0) que es el usado más comúnmente en la evaluación de toxicidad en tratamiento clínico, y la graduación se realiza respectivamente a través de observación macroscópica y biopsia de tejido patológico microscópico en fisiología clínica, y se realiza evaluación cuantitativa usando una tabla de puntuación de respuesta cutánea. Se realizan secciones de tejido patológico de la parte de tratamiento. Los resultados se muestran en la figura 14.

En la cuantificación de la respuesta cutánea, se usa el programa informático CompuSyn (para combinaciones de fármacos y para análisis general de dosis efecto) para calcular la combinación del efecto sinérgico de materiales experimentales en el alivio de las respuestas cutáneas y lesión del tejido de la piel causada por radioterapia. Los resultados se muestran en la tabla 2:

Tabla 2

Extracto (B) (mg/kg)	Extracto (A) (mg/kg)	Evaluación cuantitativa de lesión del tejido de la piel	Índice de combinación
100,0	300,0	0,96	0,68150
200,0	300,0	0,96	0,75281
400,0	100,0	0,96	0,48865
400,0	200,0	0,96	0,69204

En cuanto al índice de combinación (IC), de acuerdo con definiciones de que el valor de IC < 1 es el efecto de adición, valor de IC = 1 es el efecto independiente, y valor de IC > 1 es el efecto antagonista, una combinación de los cuatro mejores IC (IC < 0,8) obtenidos a través de cribado en el experimento se muestran en la tabla 2, indicando

inhibición significativa sobre la inflamación del tejido de la piel, en el que extracto A:extracto B está en el intervalo de 3:1 a 1:4.

Se puede saber a partir de los resultados en la tabla 2 y la figura 14 que, en el modelo de radiación de tumor animal en esta realización, se puede aliviar la inflamación, el daño al folículo piloso, la caída del pelo, dermatitis por radiación y/o respuestas cutáneas de la mano/el pie de los animales. Por lo tanto, el extracto de salvado de adlai de acuerdo con la presente invención puede usarse para tratar la enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneos, especialmente inflamación, daño al folículo piloso, caída del pelo, dermatitis por radiación y/o respuestas cutáneas de la mano/el pie.

Ejemplo 2: Experimentación humana del alivio de efectos secundarios de radioterapia sobre pacientes de cáncer de mama

Dos cápsulas de adlai (grupo de ensayo, extracto A: extracto B es 1:4) o cápsulas de aceite de oliva (grupo de control) (500 mg/cápsula) se administran después del desayuno y la cena cada día, y en total se administran cuatro cápsulas cada día.

En este ensayo clínico, se adoptan agrupamiento prospectivo y aleatorio y método doble ciego, se diseñan un grupo de ensayo y un grupo de control, y el ensayo clínico se lleva a cabo en dos fases: en la primera fase, la respuesta de la gente normal a la cápsula de adlai se ensaya en primer lugar, en la que dos cápsulas (500 mg/cápsula) se administran después del desayuno y de la cena cada día, en total se administran cuatro cápsulas cada día, y la administración continúa durante cuatro semanas. Se realiza un análisis de sangre antes del ensayo: incluyendo rutina sanguínea, función hepática (incluyendo GOT y GPT), función renal (incluyendo BUN y CRTN), parámetros sanguíneos rutinarios (incluyendo colesterol, HDL, LDL, TG y AC-azúcar). Después de administración continua durante cuatro semanas, el mismo análisis de sangre se realiza de nuevo y, después de determinar que no existe ningún efecto secundario significativo, se inicia el ensayo de segunda fase: se determina si la cápsula de adlai puede reducir eficazmente las respuestas cutáneas causadas por radiación cuando pacientes de cáncer de mama reciben radioterapia y si la calidad de vida mejora; se determinan cambios de la función inmunitaria antes y después de que los pacientes de cáncer de mama reciban radioterapia a través de análisis de sangre, se determina si la cápsula de adlai puede mejorar eficazmente la función inmunitaria, y el análisis estadístico se realiza sobre las respuestas cutáneas clínicas y los cambios fisiológicos.

En el ensayo de segunda fase, pacientes de cáncer de mama que cumplen las condiciones del sujeto se dividen en dos grupos: un grupo es el grupo de ensayo, y el otro grupo es el grupo de control. Para el grupo de ensayo, en el periodo de radioterapia, dos cápsulas de adlai (500 mg/cápsula) se administran después del desayuno y de la cena cada día, se administran cuatro cápsulas cada día, y la administración continúa durante de 5 a 7 semanas; para el grupo de control, un sustituto (placebo, el contenido es aceite de oliva) con el mismo envase se administra de la misma manera de administración. Los dos grupos se someten a análisis de sangre, el cuestionario de calidad de vida y examen físico de la piel antes y después del tratamiento.

Número de pacientes:

Primera fase: 10 personas normales

Segunda fase: 80 pacientes de cáncer de mama en el grupo de ensayo y el grupo de control respectivamente.

170 sujetos en total en las dos fases.

Método de evaluación:

Ensayo de seguridad en la primera fase: los sujetos se someten a análisis de sangre para rutina sanguínea, función hepática, función renal, y parámetros sanguíneos rutinarios, para determinar si respuestas anormales graves son causadas debido a la administración de la cápsula de adlai. La segunda fase: después de que un paciente de cáncer de mama acuerda aceptar el ensayo y firma el formulario de consentimiento del sujeto después de su explicación, el paciente se divide aleatoriamente en el grupo de ensayo o el grupo de control, y se somete a análisis de sangre: incluyendo rutina sanguínea, función hepática (incluyendo GOT y GPT), función renal (incluyendo BUN y CRTN), citoquina (incluyendo IL-1, IL-6 e IL-8) y parámetros sanguíneos rutinarios (incluyendo colesterol, HDL, LDL, TG y AC-azúcar), cuestionario de calidad de vida y fatiga, examen físico de la piel (incluyendo: el valor de pH, humedad y grasa en la superficie de la piel, función hidratante, color, temperatura, elasticidad y ultrasonido Doppler de la piel). Después de que la radioterapia se inicia, las respuestas cutáneas y el examen físico del paciente en el periodo de tratamiento se registran cada semana, incluyendo la respuesta cutánea y los cambios de color en el tratamiento de la pared torácica. Después de que la radioterapia ha terminado, los pacientes son sometidos a análisis de sangre y el cuestionario de calidad de vida y examen físico de la piel iguales que aquellos antes del tratamiento.

Radioterapia:

Cada paciente de cáncer de mama recibe radioterapia de 5 a 7 semanas, y es necesario que el sujeto tome la cápsula de adlai o el sustituto por vía oral cada día. En la radioterapia, el intervalo y el volumen de tratamiento se

formulan a través de tomografía computarizada, y la distribución de la dosis y la uniformidad de la dosis se obtienen a través de un sistema operativo de tratamiento por ordenador, y las respuestas cutáneas y otros efectos secundarios se registran en la visita del paciente cada semana.

Resultados:

5 El análisis de sangre se realiza antes y después de la administración del producto de ensayo, la administración continúa durante cuatro semanas, un paciente tiene distensión abdominal, y no existen acontecimientos adversos o efectos secundarios graves. En el ensayo de segunda fase, 67 pacientes participan en el cribado de sujetos, y 51 pacientes se enrolan, 16 pacientes entre los sujetos no tienen intención de participar en este programa debido a: 10 alergia, edema e incomodidad de las extremidades inferiores causada por tratamiento químico, siendo incapaces de cooperar el tratamiento debido a ajetreo laboral, falta de intención, haber tomado demasiados fármacos y ser incapaz de participar en el tratamiento, el resto de pacientes firman el formulario de consentimiento, se someten a análisis de sangre, examen físico de la piel, registro fotográfico de la parte afectada, cuestionario y administración del producto de ensayo.

15 En la segunda fase, 2 pacientes tienen distensión abdominal, y 1 paciente presenta heces sueltas, en la que un paciente deja de participar en el ensayo debido a los efectos secundarios tales como distensión abdominal, y un paciente abandona el ensayo. De acuerdo con el plan de tratamiento, el periodo de tratamiento para cada sujeto es de aproximadamente 5 a 7 semanas, y se espera que 160 sujetos se enrolen. Con el fin de mejorar la comprensión del sujeto de la participación en este plan, aumentar el número de muestra, y aumentar la fiabilidad de la recopilación de datos, la relación del grupo de ensayo respecto al grupo de control se ajusta de 1:1 a 2:1. El número 20 de casos individuales cuyos datos son analizables es 27, y los resultados analíticos se muestran en la tabla 3 a la tabla 6.

25 La tabla 3 muestra la comparación de valores promedio del análisis de sangre de personas normales antes y después de la administración of la cápsula de adlai en la primera fase, en la que no existe ninguna diferencia antes y después de la administración entre el grupo de ensayo y el grupo de control, lo que indica que la cápsula de adlai no afectará a las funciones del hígado y el riñón.

Tabla 3

	Promedio preensayo ($\pm$ SD)	Promedio postensayo ($\pm$ SD)	Valor p
Edades	54,9 (11,36)		
Altura	159,1 (4,31)		
Peso	58,3 (6,57)		
RBC	4,4 (0,65)	4,4 (0,79)	0,648
Hemoglobina	13,3 (1,30)	13,3 (1,09)	0,870
WBC	5,7 (1,22)	5,6 (0,83)	0,799
Hct	38,8 (3,45)	39,5 (3,06)	0,285
Plaquetas	267,1 (29,13)	265,7 (41,35)	0,859
BUN	11,2 (3,46)	12,0 (1,83)	0,375
Creatinina	0,6 (0,10)	0,6 (0,13)	0,670
GOT	26,4 (5,85)	23,8 (5,27)	0,045
GPT	25,2 (10,1)	22,5 (9,64)	0,158
Colesterol	195,8 (44,70)	201,4 (33,07)	0,523
HDL	51,7 (13,84)	50,6 (11,39)	0,393
LDL	117,5 (34,46)	120,8 (25,63)	0,688
TG	100,2 (52,45)	105,8 (64,24)	0,491
ACazúcar	103,0 (24,21)	109,6 (30,71)	0,024

La tabla 4 muestra la graduación de los índices RTOG/EORTC de respuesta cutánea cuando pacientes de cáncer de mama reciben tratamiento, y puede verse a partir de los análisis preliminares de los resultados que, 3/14 (21,4%) de los pacientes en el grupo de ensayo tienen un grado de respuesta cutánea mayor que 1, y 6/13 (46,2%) de los pacientes en el grupo de control tienen un grado de respuesta cutánea mayor que 1.

5

Tabla 4

	Grupo de experimento (n = 14)	Grupo de control (n = 13)	Valor p
Reacción cutánea			0,342
Grado 0	4 (28,6%)	1 (7,7%)	
Grado 1	7 (50,0%)	6 (46,2%)	
Grado 2	3 (21,4%)	5 (38,5%)	
Grado 3	0 (0,0%)	1 (7,7%)	
Reacción cutánea			0,173
≤Grado 1	11 (78,6%)	7 (53,8%)	
>Grado 1	3 (21,4%)	6 (46,2%)	
Grado 0: Sin respuesta			
Grado 1: con folículos pálidos, eritema, caída del pelo, sudoración reducida y descamación en seco			
Grado 2: con eritema moderado y descamación y edema de infiltración parcheada, más obvia en los pliegues cutáneos para la mayoría de los pacientes			
Grado 3: con descamación y traumatismo de infiltración, y abrasión y hemorragia			
Grado 4: con necrosis, úlcera, hemorragia espontánea, y otros síntomas			
Grado 5: muerte			

La tabla 5 muestra características clínicas y patológicas de pacientes de cáncer de mama después de la administración de la cápsula de adlai, en la que no existe ninguna diferencia de distribución entre el grupo de ensayo y el grupo de control.

10

Tabla 5

	Grupo de experimento (n = 14)	Grupo de control (n = 13)	Valor p
Edades	51,4 (±13,7)	51,6 (±10,7)	0,969
Fase clínica del tumor primario			0,733
0	1 (7,1%)	1 (7,7%)	
1	3 (21,4%)	1 (7,7%)	
1b	0 (0,0%)	1 (7,7%)	
1c	3 (21,4%)	5 (38,5%)	
2	5 (35,7%)	4 (30,8%)	

3	1 (7,1%)	0 (0,0%)	
es	1 (7,1%)	1 (7,7%)	
Fase clínica del tumor primario			0,340
1a	3 (21,4%)	1 (7,7%)	
1b	3 (21,4%)	3 (23,1%)	
1c	3 (21,4%)	5 (38,5%)	
2	3 (21,4%)	2 (14,3%)	
3	2 (14,3%)	0 (0,0%)	
es	0 (0,0%)	2 (14,3%)	
Clasificación patológica			0,308
Carcinoma ductal infiltrante	13 (92,9%)	10 (76,9%)	
Carcinoma lobular Infiltrante	1 (7,1%)	1 (7,7%)	
Carcinoma ductal in situ	0 (0,0%)	2 (15,4%)	
Clasificación quirúrgica			0,511
Cirugía para conservar el seno	12 (85,7%)	11 (84,6%)	
Mastectomía radical modificada	0 (0,0%)	1 (7,7%)	
Otras	2 (14,3%)	1 (7,7%)	
Radioterapia			0,363
Radioterapia convencional	4 (28,6%)	4 (30,8%)	
Radioterapia modulada en intensidad	8 (57,1%)	9 (69,2%)	
Tomoterapia	2 (14,3%)	0 (0,0%)	

La tabla 6 muestra cambios del análisis de sangre antes y después del tratamiento de pacientes de cáncer de mama después de radioterapia, en la que no existe ninguna diferencia significativa.

Tabla 6

	Grupo de experimento (n = 14)	Grupo de control (n = 13)	Valor p
RBC			0,323
Preensayo	4,12 (0,40)	4,04 (0,40)	
Postensayo	4,37 (0,52)	4,13 (0,43)	
Hgb			0,310
Preensayo	12,04 (1,72)	12,11 (1,55)	
Postensayo	12,54 (1,25)	12,20 (0,94)	
WBC			0,719
Preensayo	5,24 (2,06)	5,74 (2,10)	
Postensayo	3,79 (0,90)	4,04 (0,89)	
Hct			0,219

ES 2 638 149 T3

Preensayo	35,42 (4,45)	35,56 (4,14)	
Postensayo	37,18 (3,17)	35,92 (2,54)	
Plaquetas			0,160
Preensayo	231,60 (84,74)	273,54 (68,67)	
Postensayo	172,00 (46,44)	179,15 (67,65)	
BUN			0,179
Preensayo	10,45 (3,05)	11,86 (4,93)	
Postensayo	10,86 (3,59)	10,67 (3,95)	
Creatinina			0,193
Preensayo	0,57 (0,12)	0,62 (0,17)	
Postensayo	0,59 (0,11)	0,61 (0,14)	
GOT			0,207
Preensayo	25,86 (5,93)	22,85 (5,40)	
Postensayo	25,50 (4,45)	25,62 (10,45)	
GPT			0,303
Preensayo	24,14 (10,10)	22,92 (11,18)	
Postensayo	22,93 (6,74)	26,08 (15,75)	
Cho			0,584
Preensayo	196,43 (35,72)	189,38 (29,11)	
Postensayo	181,79 (35,71)	180,46 (24,44)	
HDL			0,814
Preensayo	46,30 (12,19)	54,69 (14,73)	
Postensayo	45,57 (10,80)	54,59 (11,03)	
LDL			0,593
Preensayo	121,26 (36,59)	54,69 (27,13)	
Postensayo	111,35 (36,50)	97,13 (27,36)	
TG			0,256
Preensayo	122,14 (60,31)	100,69 (50,44)	
Postensayo	125,64 (51,51)	161,62 (215,25)	
ACazúcar			0,866
Preensayo	99,64 (10,67)	103,62 (13,84)	
Postensayo	97,93 (14,12)	101,38 (17,06)	

Los resultados de esta realización muestran que la piel seca, induración, erupción, descamación, acné, eritema multiforme, ruptura y/o ulceración de la piel de los pacientes de cáncer de mama pueden aliviarse; por lo tanto, el extracto de salvado de adlai de acuerdo con la presente invención puede usarse para tratar la enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneos, especialmente piel seca, induración, erupción, descamación, acné, eritema multiforme, ruptura y/o ulceración de la piel.

Aunque se han descrito e ilustrado realizaciones de la presente invención, diversas modificaciones y mejoras pueden ser realizadas por expertos en la materia. Se pretende que la presente invención no esté limitada a las formas particulares tal como se ilustran. La presente invención se define en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un extracto de salvado de adlai, en donde el extracto de salvado de adlai comprende un extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) y un extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B), y la relación en peso del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:4.
5
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el adlai es *Coix lachryma-jobi* L.
3. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el alcohol de C1 a C7 es etanol.
4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el alcohol de C1 a C7 es una solución alcohólica con una concentración de aproximadamente el 49% (v/v) a aproximadamente el 99,9% (v/v).
10
5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) se extrae a una presión de aproximadamente 150 bares a aproximadamente 500 bares y una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 80°C.
15
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la relación en peso del extracto en alcohol de C1 a C7 de salvado de adlai (A) respecto al extracto en fluido supercrítico de dióxido de carbono de salvado de adlai (B) es de aproximadamente 3:2 a aproximadamente 1:2.
7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una composición farmacéutica, una composición alimentaria o una composición cosmética.
20
8. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el uso en el tratamiento de una enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneo.
9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneo se selecciona entre el grupo que consiste en inflamación, daño del folículo piloso, atrofia de la piel, hematoma, quemadura, queilitis, piel seca, enrojecimiento, alopecia, hiperpigmentación, hipopigmentación, induración, fibrosis, reacción en el lugar de la inyección, cambio de extravasación, cambio en las uñas, fotosensibilidad, prurito, picazón, sarpullido, descamación, acné, acneiforme, dermatitis asociada con la radiación, eritema multiforme, reacción de la piel de la mano-el pie, ruptura de la piel, úlcera de decúbito, estrías, telangiectasia, ulceración y urticaria.
25
10. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde la enfermedad de la piel y/o el tejido subcutáneo es causada por radiación.
30
11. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la radiación es radiación para uso en radioterapia para tratar un tumor.

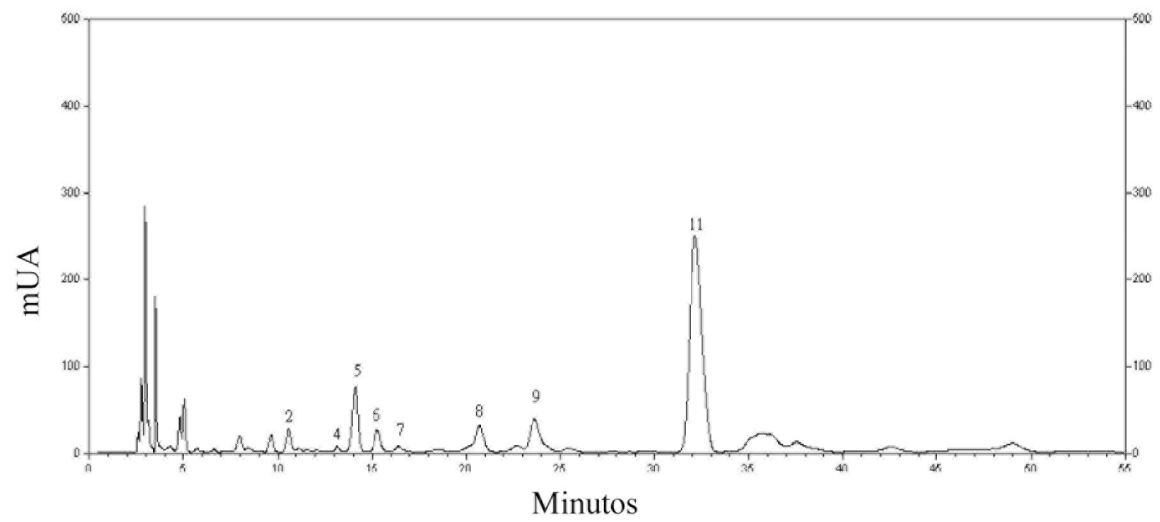


FIG. 1

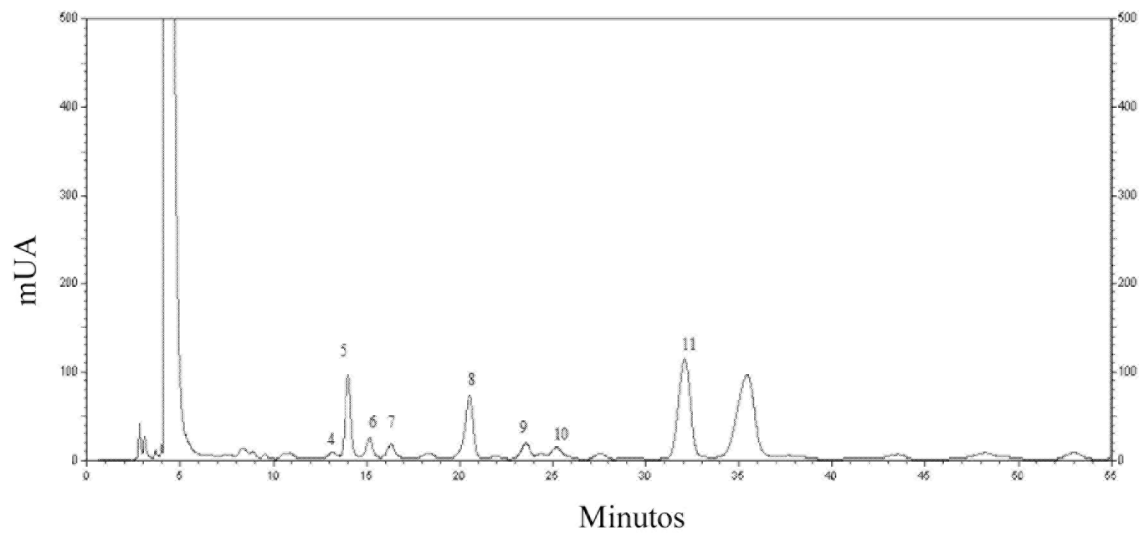


FIG. 2

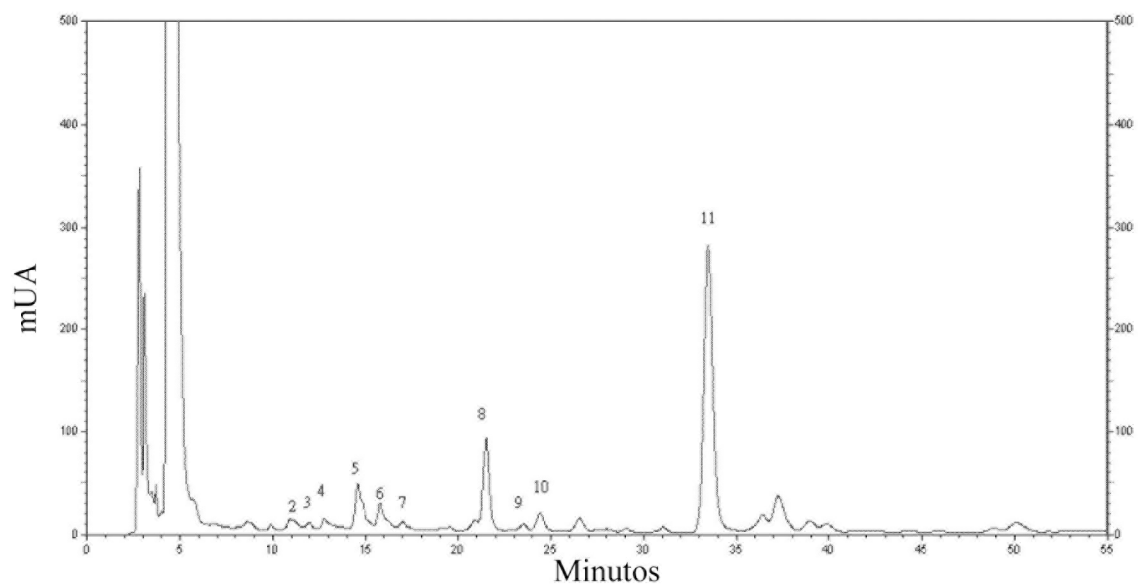


FIG. 3

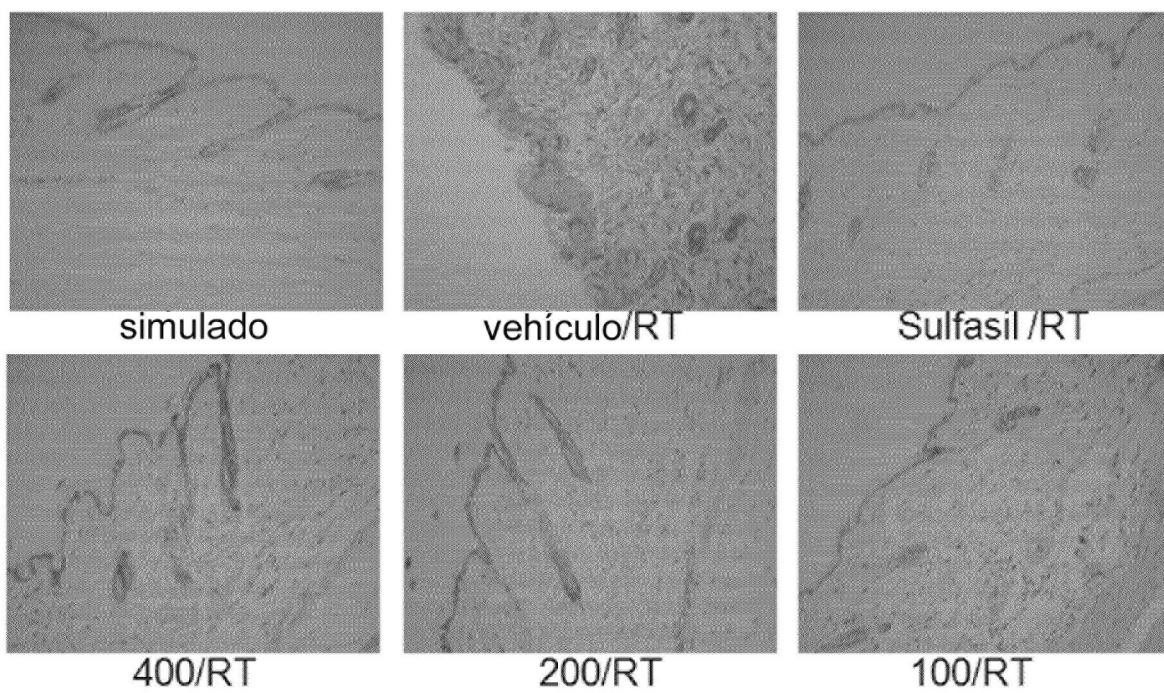


FIG. 4

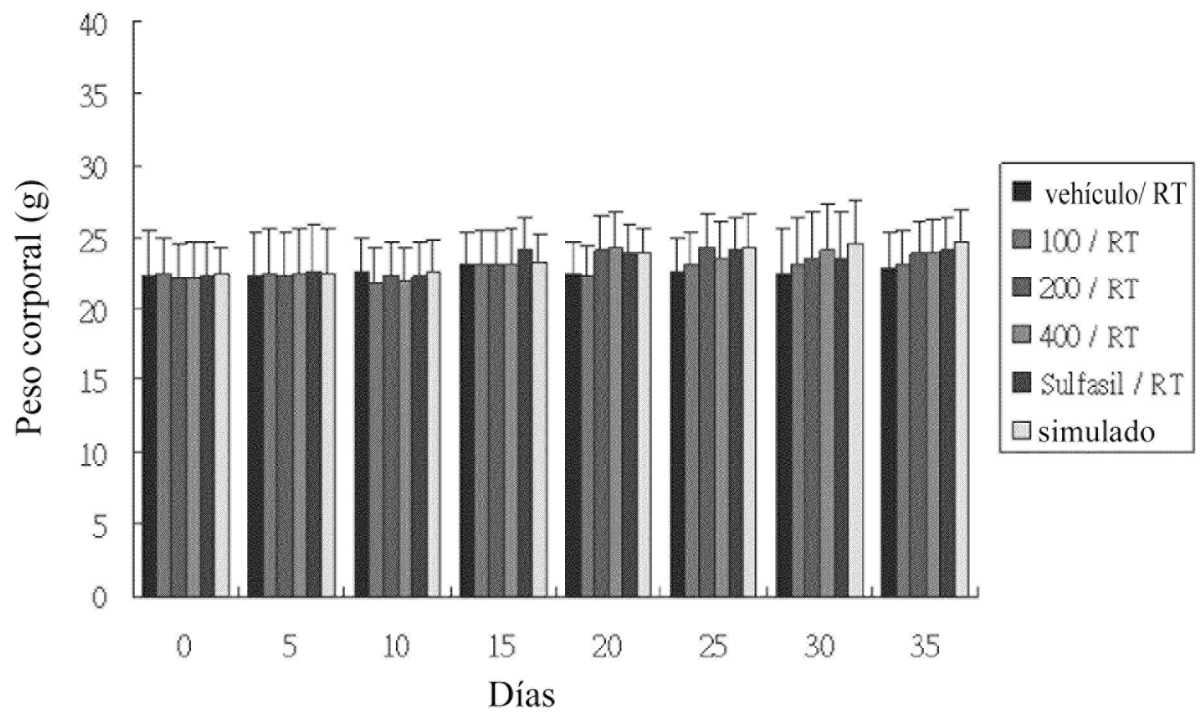


FIG. 5

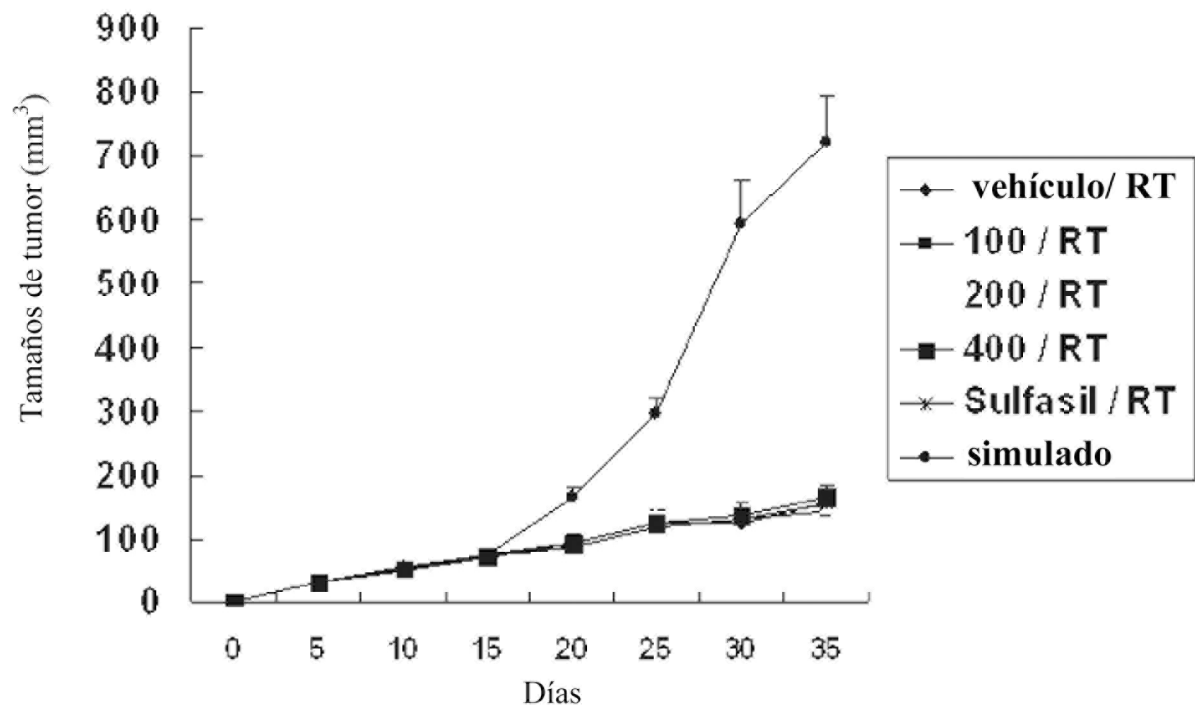


FIG. 6

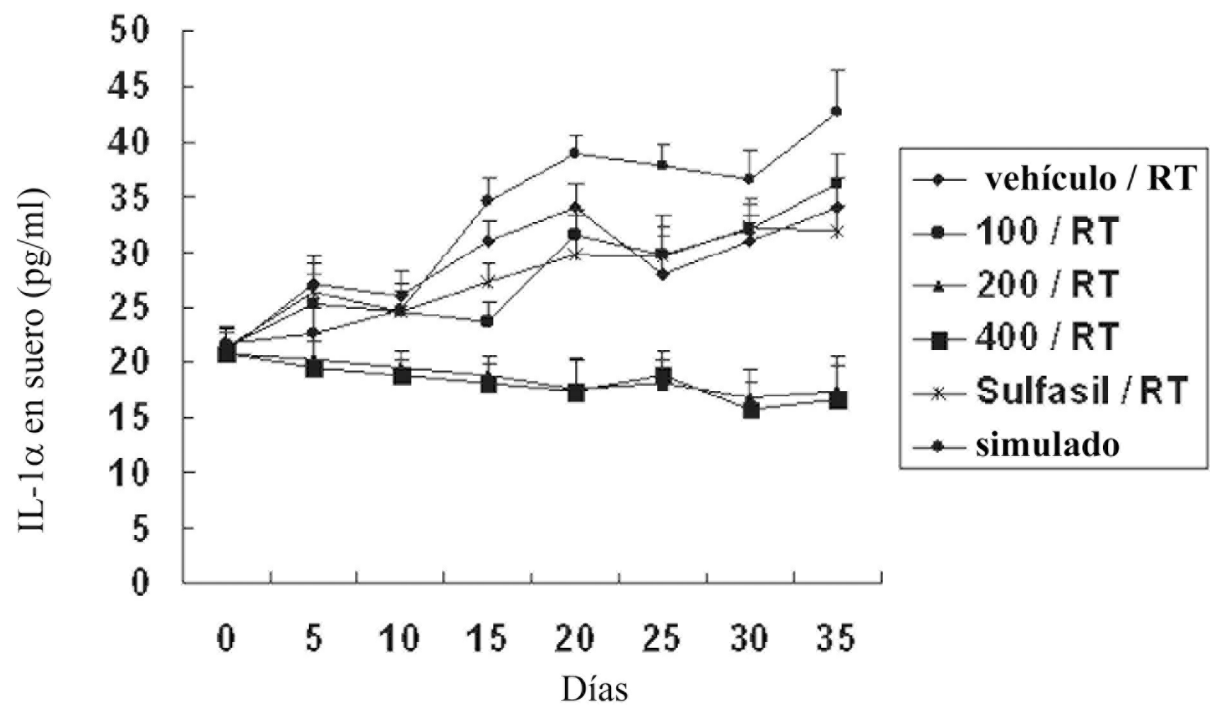


FIG. 7

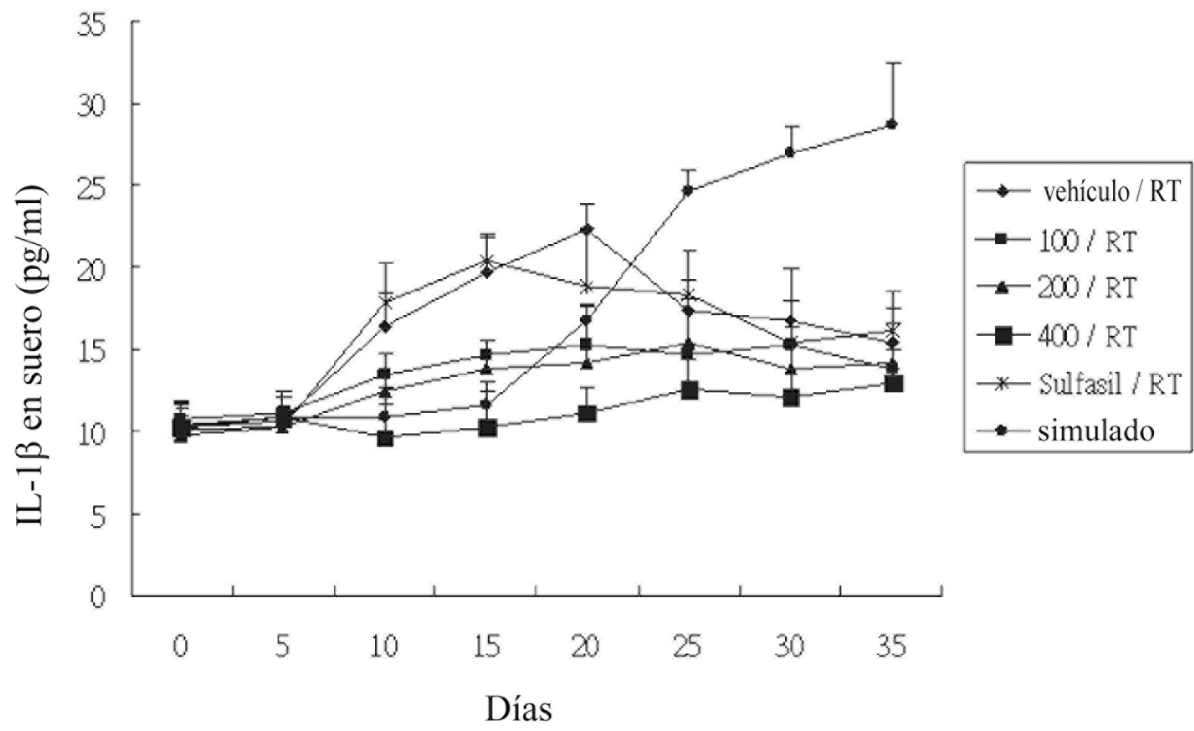


FIG. 8

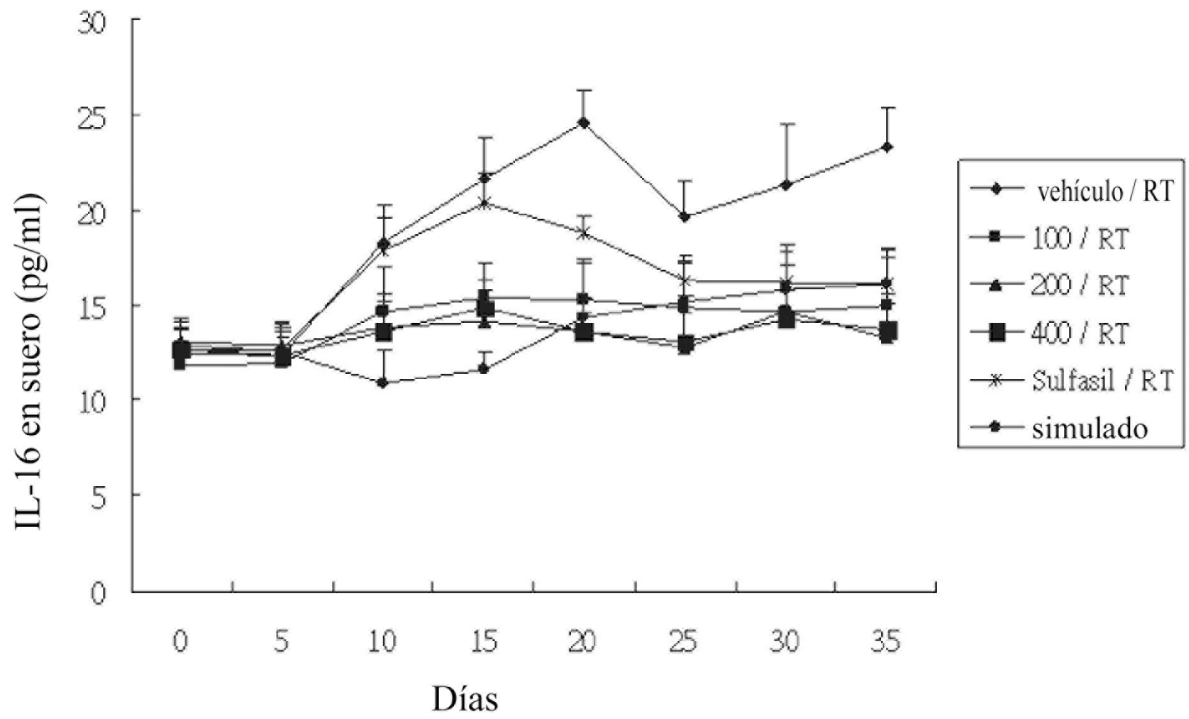


FIG. 9

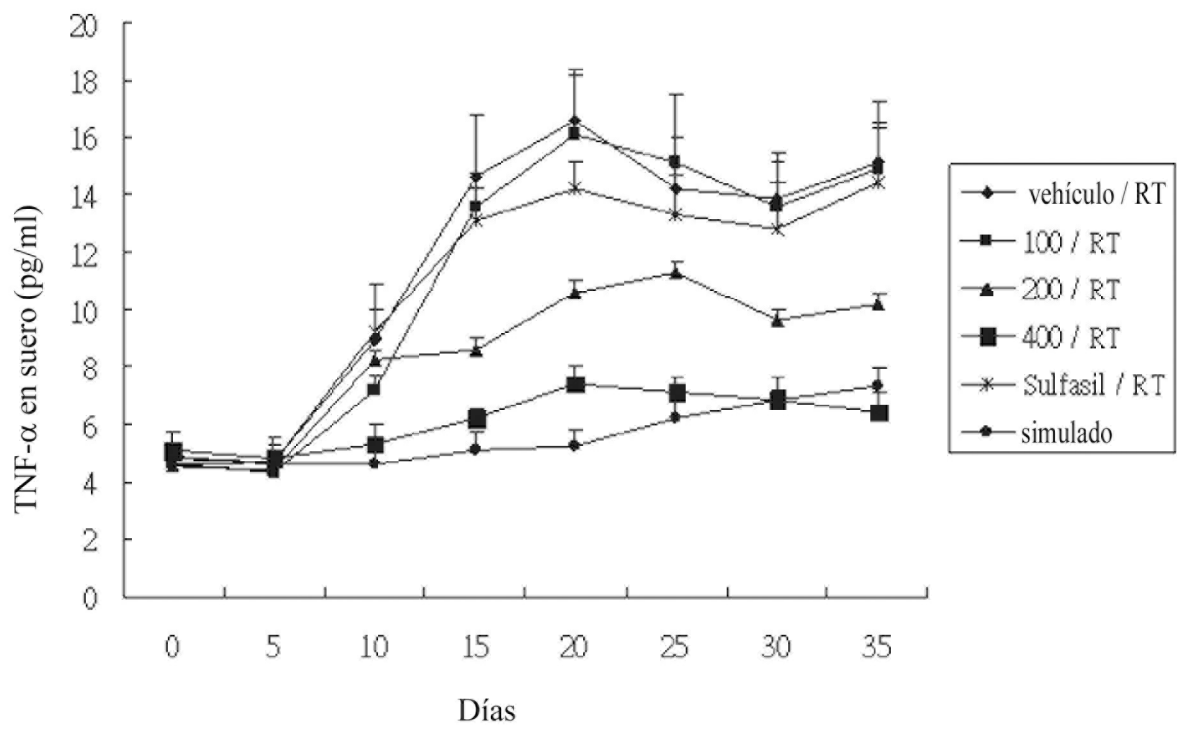


FIG. 10

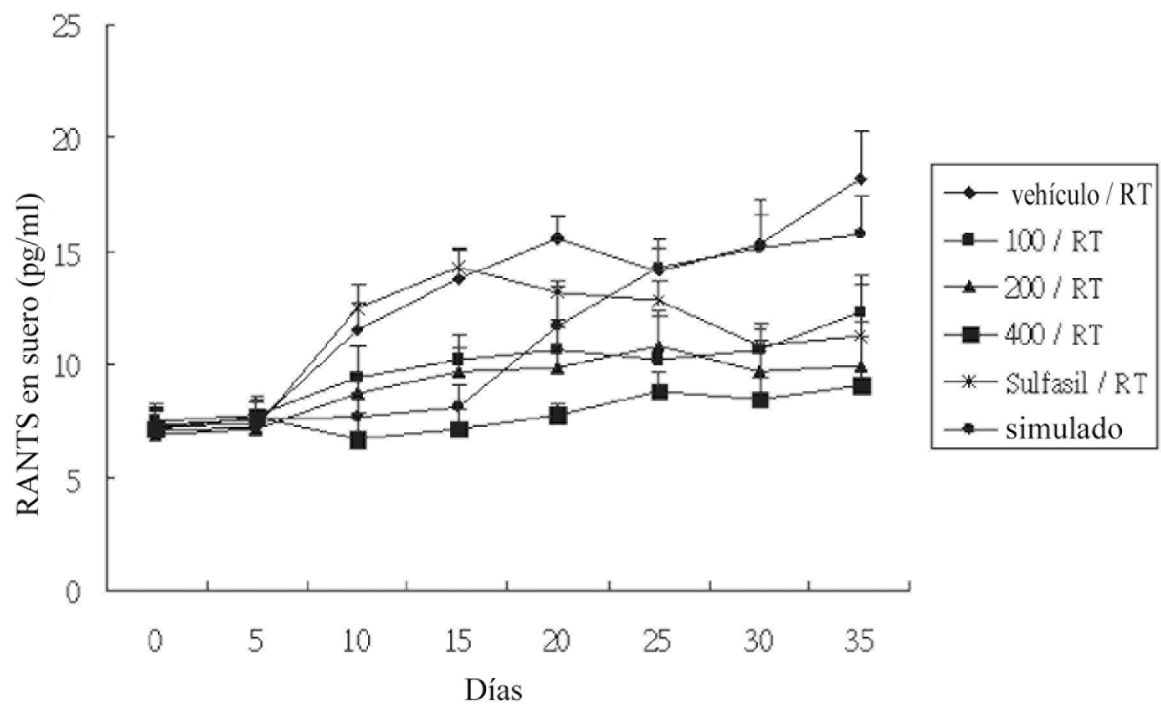


FIG. 11

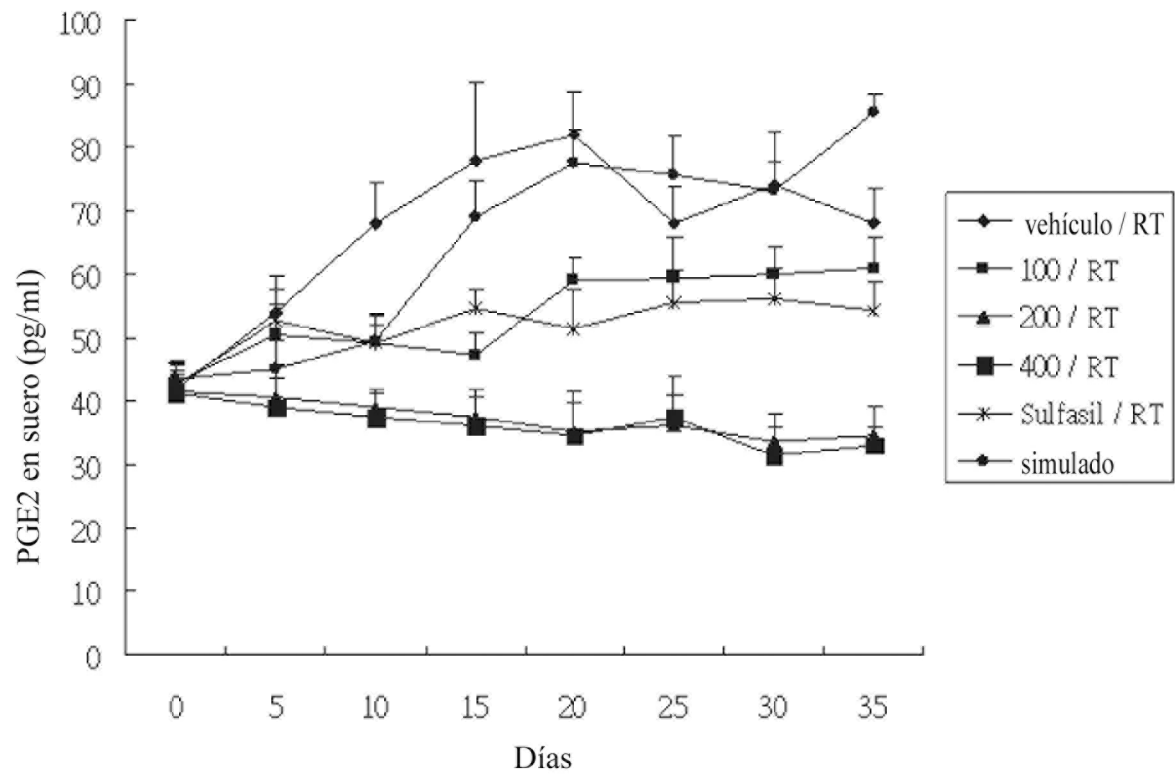


FIG. 12

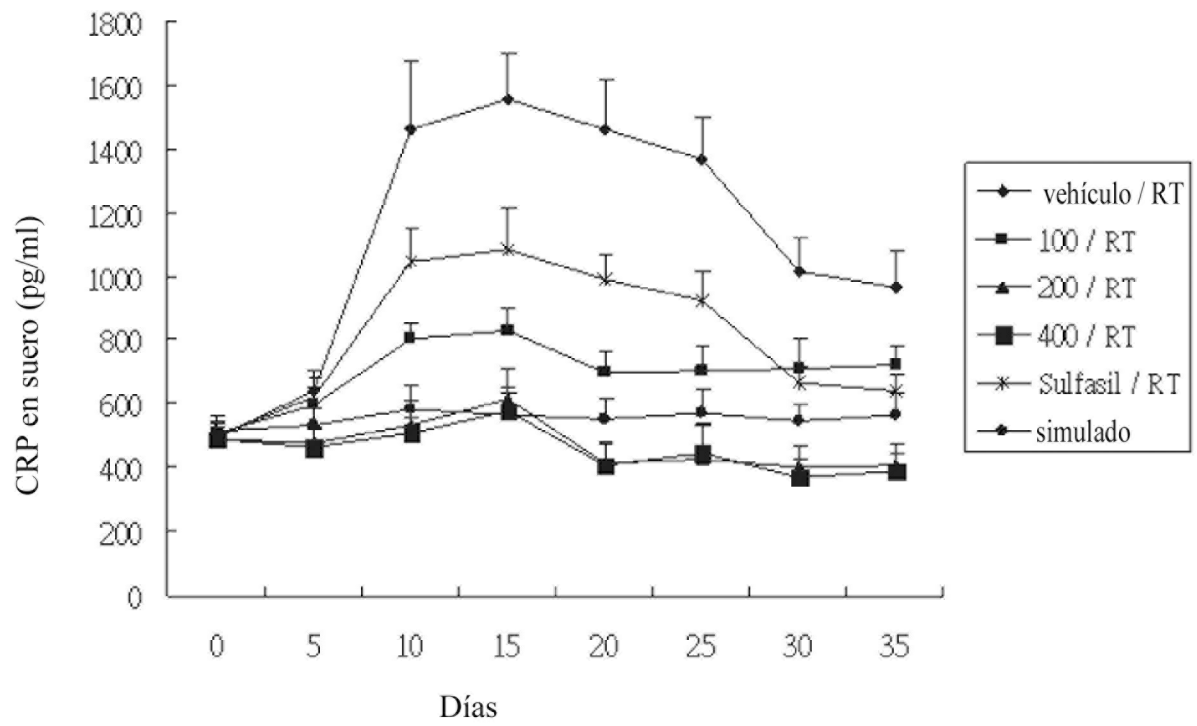


FIG. 13

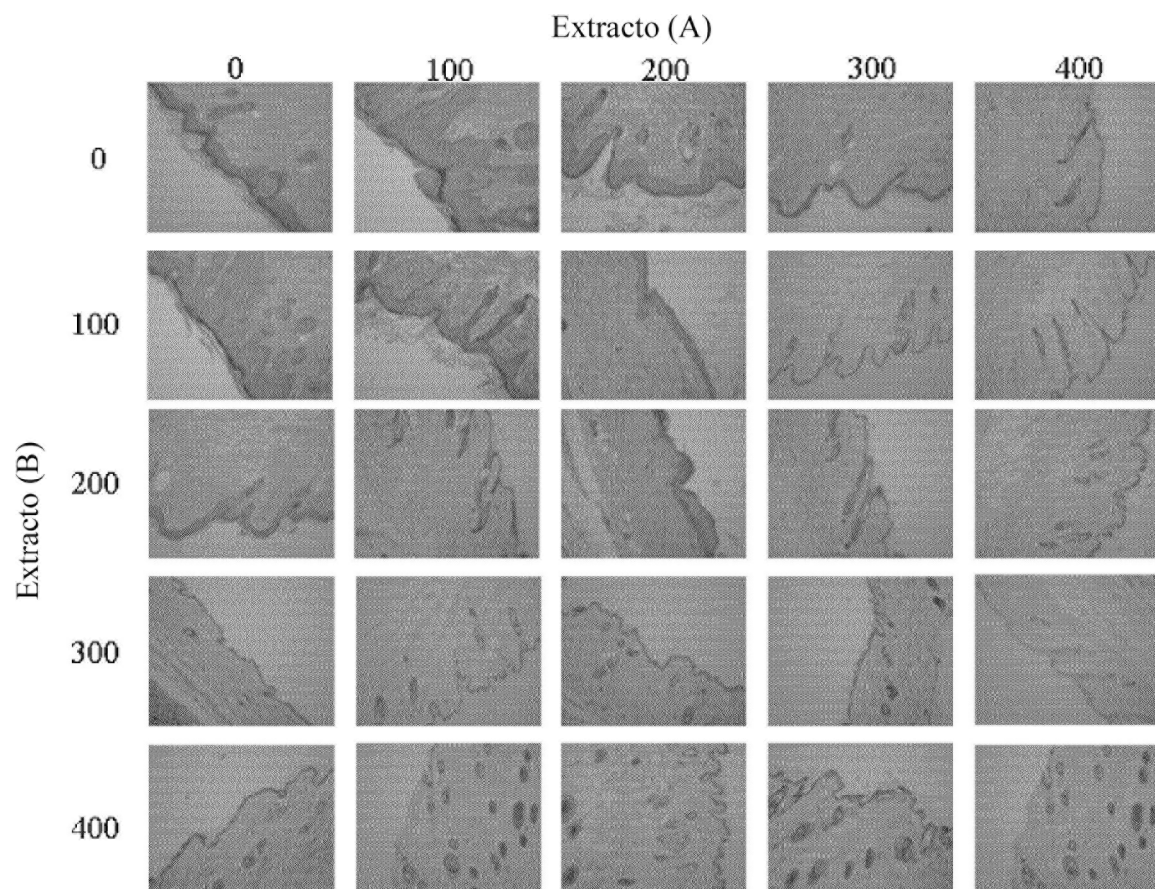


FIG. 14