

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 245**

51 Int. Cl.:

A61P 31/00 (2006.01)
A61K 36/484 (2006.01)
A61K 36/539 (2006.01)
A61K 36/708 (2006.01)
A61K 36/739 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2011 PCT/IL2011/050081**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12090205**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2011 E 11817422 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2658562**

54 Título: **Extractos vegetales para el tratamiento y prevención de infecciones**

30 Prioridad:

28.12.2010 US 201061427495 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2017

73 Titular/es:

KAMEDIS LTD. (50.0%)
P.O.B. 58196, Kiryat Atidim,
6158101, Tel-Aviv, IL y
BIO-FD & C. CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

ROZENBLAT, SHARON;
JUNG, DAIHYUN;
MOH, SANGHYUN;
KIM, SUJUNG y
LEE, JUNGHUN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 645 245 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

Extractos vegetales para el tratamiento y prevención de infecciones

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a extractos vegetales y, de manera más específica, pero no exclusivamente, al uso de estos para el tratamiento o prevención de infecciones, incluidas infecciones secundarias de enfermedades inflamatorias crónicas.

10 La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica con prevalencia a lo largo de la vida de 10-20 % en niños y 1-3 % en adultos. La incidencia de la enfermedad parece estar aumentando especialmente en países desarrollados. La DA se asocia a hiperreactividad cutánea a desencadenantes ambientales que son inocuos para individuos no atópicos normales y se caracteriza por prurito, lesiones eccematosas, xerosis (piel seca) y liquenización de la piel (engrosamiento de la piel y marcas cutáneas). Con frecuencia, la DA se complica por infecciones recurrentes de las lesiones cutáneas causadas por patógenos bacterianos, víricos y fúngicos (p. ej., la colonización por *Staphylococcus aureus* se produce en 85-90 % de los pacientes con DA). Los tratamientos para infecciones secundarias disponibles a la fecha para pacientes con DA no curan el trastorno cutáneo, pero controlan la gravedad y duración de sus síntomas. Estos tratamientos incluyen principalmente antibióticos para tratar las infecciones secundarias, corticoesteroides tópicos e inhibidores de calcineurina tópicos (agentes inmunosupresores). No se recomienda el uso prolongado de estos tratamientos, especialmente en niños pequeños, debido a sus posibles efectos secundarios.

20 Se sabe muy poco sobre los mecanismos biológicos subyacentes de la DA. Diversos tipos de células parecen participar, incluidas células inmunitarias y epidérmicas, incluidos linfocitos T, mastocitos, eosinófilos, células de Langerhans y queratinocitos. También participan otros factores que incluyen citocinas e IgE. Muchos informes iniciales académicos y clínicos sugieren diversos mecanismos patógenos diferentes. Un posible mecanismo es un defecto inmunitario relacionado con la elevación de las células T_H2 que interactúan con las células de Langerhans y resulta en la producción aumentada de las interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13. Esto conduce a un aumento de los niveles de IgE y reducción de los niveles de interferón gamma. Otra teoría señala una función de barrera defectuosa en el estrato córneo que conduce al ingreso de antígenos, que resulta en la producción de diversas citocinas inflamatorias.

25 Recientemente, se sugirió que la elevada susceptibilidad a infecciones bacterianas en pacientes con DA se asocia al mecanismo de defensa innato defectuoso, específicamente, la baja expresión de péptidos antimicrobianos, conocidos como β -defensinas. A partir de biopsias cutáneas de lesiones de DA se demostró la expresión baja de forma deficiente de péptidos antimicrobianos inducidos por inflamación que proporciona, de esta manera, una posible explicación a la susceptibilidad de los pacientes con DA a las infecciones cutáneas.

35 Las β -defensinas, incluidas las β -defensinas humanas (hBDs), son moléculas anfipáticas, catiónicas, pequeñas, naturales que participan en el mecanismo de defensa innato. En la piel, los queratinocitos secretan estos péptidos y tienen una función fundamental en la destrucción de forma directa de los microorganismos invasores y en modificar los eventos inflamatorios. Estos péptidos rompen la membrana del microbio diana o penetran la membrana microbiana e interfieren con las funciones intracelulares. También tienen funciones adicionales, tales como la regular las respuestas inflamatorias e inmunitarias, quimioatraer células inmunitarias o inflamatorias hacia sitios de heridas o infección/inflamación, acelerar la angiogénesis y promover la curación de heridas.

40 La β -defensina-3 humana (hBD-3) exhibe una actividad de destrucción potente contra *S. aureus* y otras bacterias gram-positivas, además de actividad contra organismos gram-negativos. Asimismo, la actividad antimicrobiana de hBD-3 se conserva a concentraciones salinas fisiológicas. Por lo tanto, la producción endógena de hBD-3 en la epidermis puede proporcionar un escudo antimicrobiano para proteger a los tejidos cutáneos contra la invasión bacteriana de patógenos tales como *S. aureus*.

45 La regulación de la expresión de las β -defensinas incluida la expresión de β -defensina-2 humana (hBD-2) y β -defensina-3 humana (hBD-3) es un mecanismo complicado; su expresión se eleva mediante microorganismos, TNF- α o IFN- γ y se reduce mediante citocinas producidas por mastocitos y linfocitos T cooperadores tipo 2 (específicamente IL-4 e IL-13).

50 En estudios *in vitro* utilizando queratinocitos primarios se demostró que la expresión de las citocinas IL-4 e IL-13 inhibe la expresión de las β -defensinas [Albanesi C. et al., J. Immunol. (2007) 179(2): 984-992]. Esta correlación inversa también se demostró en biopsias cutáneas humanas [Nomura I. et al., J. Immunol. (2003) 171(6), 3262-3269].

55 Se han descrito diversos extractos herbarios que inhiben la expresión de IL-4 o IL-13 inducida por mastocitos y linfocitos T cooperadores tipo 2. Estos incluyen prescripción de GammiDanguieumja (*Rehmannia glutinosa*, *Angelica gigas*, etc.) [Na H.T. et al., Inflammation (2004) 28, 291-297], flavonoides (Avanin, Luteolin, Apigenin, Fisetin, etc.) [Kawai, M. et al., Allergology International (2007) 56:113-123], *Ailanthus altissima* (EAa) [Hua Jin, M. et al., Biol Pharm Bult (2006) 29: 884-888], *Glycyrrhiza glabra* L. (raíz de regaliz) [Ram A et al., Int Immunopharmacol. (2006)

6(9):1468-77], *Cimicifuga racemosa* [Kim CD et al., Immunopharmacol Immunotoxicol (2004) 26: 299-308] y *Cimicifuga racemosa* [Kim CD et al., supra].

5 Las hierbas que comprenden propiedades antiinflamatorias y antialérgicas se han descrito anteriormente en la técnica. Estas incluyen *Sanguisorba officinalis* que se conoce en la medicina china tradicional como tratamiento para el eccema y el dolor en la piel y *Silybum marianum* que anteriormente se describió que comprende propiedades antiinflamatorias.

10 La patente estadounidense n.º 6235287 describe diterpenos, así como extractos y concentrados de la planta *Curcuma amada* que contienen al menos uno de dichos diterpenos para uso como medicamentos para la inmunomodulación y para aliviar el dolor, y para el tratamiento o prevención de enfermedades de hipersensibilidad y trastornos autoinmunitarios.

15 Las patentes estadounidenses números 6566405 y 7252845 describen composiciones que contienen compuestos aromáticos y terpenoides que están presentes en y, preferiblemente, pueden derivar de la planta *Alpinia galanga* (*Zingiberaceae*). Estas muestran efectos sinérgicos con respecto a la inmunomodulación y suprimen de forma significativa las reacciones de hipersensibilidad. Por lo tanto, 6566405 contempla el uso de estas para el tratamiento o prevención de reacciones y afecciones alérgicas mediadas por IgE, tales como asma, rinitis alérgica, un eccema tópico o anafilaxia, y trastornos autoinmunitarios, tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, artritis reumatoide o psoriasis, así como para el alivio del dolor.

20 La patente estadounidense n.º 5466452 describe composiciones herbarias farmacéuticas para el tratamiento de trastornos cutáneos tales como eccema y psoriasis. Específicamente, 5466452 describe la preparación de un extracto o extractos de hierbas (p. ej. de *Potentilla chinensis*, *Rehmannia glutinosa*, *Radix paeoniae lactiflorae/veitchii*, *Dictamnus augustifolia*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Ledebouriella sesloides*, *Tribulus terrestris*, *Lopatheri gracile*, *Schizonepeta tenuifolia*, *Akebia trifoliata*) que proporcionan un agente antiinflamatorio, un estimulante corticosuprarrenal y un agente protector de cortisol mediante destilación al vapor y decocción, y luego tratamiento de los extractos para reducir el contenido de polisacáridos o azúcar.

25 La patente estadounidense n.º 6676975 describe composiciones herbarias chinas para el tratamiento de eccema y psoriasis. Específicamente, 6676975 se refiere a un material que es adecuado para el tratamiento de una enfermedad atópica, eccema no atópico o psoriasis. El material se puede extraer de una decocción liofilizada de una mezcla que comprende las siguientes hierbas chinas: *Radix Ledebouriella*, *Fructus Tribuli*, *Herba Potentilla chinensis*, *Caulis Clematis armandii*, *Radix Rehmannia*, *Radix Glycyrrhiza*, *Radix Paeonia rubra*, *Cortex Dictamni radidis*, *Herba Lopatheri*, *Spica Schizonepetae*.

30 La patente estadounidense n.º 7.211.567 describe una composición para prevenir y tratar la alergia tipo I (incluida la dermatitis atópica). La astragalina necesaria para preparar las composiciones que se describen en 7.211.567 se puede obtener de cualquier planta que contiene astragalina, p. ej., *Ailanthus altissima*.

35 La técnica anterior adicional incluye las patentes estadounidenses números 6.143.498, 6329340, 6335318, 6.420.116, 6911577 y 7.223.840 y solicitudes de patente estadounidenses números 20060147442, 20070104722 y 20060036083.

Compendio de la invención

40 La presente invención generalmente se refiere a usos médicos de una composición que comprende un extracto vegetal de *Sanguisorbae officinalis* y un extracto vegetal de *Ailanthus altissima*. La composición puede comprender, además, uno o más de un extracto vegetal de *Galla rhois gallnut*, un extracto vegetal de *Glycyrrhiza Glabra*, un extracto vegetal de *Rheum palmatum* y un extracto vegetal de *Scutellaria baicalensis*.

45 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende un extracto vegetal acuoso de *Sanguisorbae officinalis* y un extracto vegetal acuoso de *Ailanthus altissima* para uso en el tratamiento o prevención de una infección cutánea en un sujeto que lo necesita, en donde la infección cutánea es una enfermedad atópica, una dermatitis de contacto, una dermatitis numular, una dermatitis por radiación, una quemadura, un eccema no atópico o una escara de decúbito. La infección puede ser secundaria con respecto a una inflamación crónica o a dermatitis atópica (DA).

En una realización, la composición puede actuar para reducir la secreción de una citocina tipo Th2 seleccionada de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13 en una célula de dicho sujeto.

50 En una realización, la composición puede actuar para aumentar la expresión de una betadefensina humana en una célula de dicho sujeto.

55 En una realización, la composición puede comprender, además, uno o más de un extracto vegetal de *Galla rhois gallnut*, un extracto vegetal de *Glycyrrhiza glabra*, un extracto vegetal de *Rheum palmatum*, un extracto vegetal de *Scutellaria baicalensis*, un extracto vegetal de *Peucedanum praeruptorum*, un extracto vegetal de *Cimicifuga racemosa*, un extracto vegetal de *Silybum marianum* y *glicirrizato dipotásico*.

En una realización, el extracto vegetal de *Sanguisorbae officinalis* y los extractos vegetales de *Ailanthus altissima* se pueden purificar de forma adicional utilizando una cromatografía en resina que comprende una resina macroporosa.

5 Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto vegetal acuoso de *Sanguisorbae officinalis* y Ailantona a una concentración de al menos alrededor de 0,01 % p/p para uso en el tratamiento o prevención de una infección cutánea en un sujeto que lo necesita, en donde la infección cutánea es una enfermedad atópica, una dermatitis de contacto, una dermatitis numular, una dermatitis por radiación, una quemadura, un eccema no atópico o una escara de decúbito. La infección puede ser secundaria con respecto a una inflamación crónica o a dermatitis atópica.

10 En una realización de este aspecto de la invención, la composición puede comprender, además, uno o más de un extracto vegetal de *Galla rhois gallnut*, un extracto vegetal de *Glycyrrhiza Glabra*, un extracto de raíz de *Rheum palmatum*, un extracto de fruto de *Cnidium monnieri* y un extracto de raíz de *Scutellaria baicalensis*.

15 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una forma de dosificación unitaria que comprende un extracto acuoso de cada uno de un extracto vegetal de *Sanguisorbae officinalis* a una concentración de 0,5-2 % peso/peso (p/p); extracto vegetal de *Ailanthus altissima* a una concentración de 0,5-2 % p/p o Ailantona a una concentración de al menos 0,01 % p/p; y extracto de raíz de *Scutellaria baicalensis* o extracto de raíz de *Rheum palmatum* raíz o una combinación de estos a una concentración de 0,5-2 % p/p.

La composición se puede proporcionar como un sistema de suministro que comprende un aplicador y la composición de la presente invención contenida dentro de este.

20 La forma de dosificación unitaria se puede seleccionar de una forma de dosificación unitaria tópica, oral, pulmonar u ocular que comprende Ailantona a una concentración de al menos alrededor de 0,01 % peso/peso.

En una realización, la composición se puede preparar mediante un método que comprende: (a) someter una planta a x 1-10 volúmenes de agua para producir un extracto de la planta; y (b) reducir la cantidad de sales orgánicas o metales pesados o almidón en el extracto vegetal utilizando una resina macroporosa que resulta en un contenido elevado de un ingrediente activo que está presente en el extracto vegetal.

25 Según algunas realizaciones, la composición se formula para administración tópica, ocular, oral o pulmonar.

Según algunas realizaciones, la concentración de la Ailantona es de alrededor de 0,01-1 %.

Según algunas realizaciones, la concentración de la Ailantona es de alrededor de 0,01-5 %.

Según algunas realizaciones, el extracto vegetal de *Sanguisorbae officinalis* y el al menos un extracto vegetal adicional se formulan en una coformulación.

30 Según algunas realizaciones, el extracto vegetal de *Sanguisorbae officinalis* y el al menos un extracto vegetal adicional se formulan en formulaciones separadas.

Según algunas realizaciones, la concentración de cada uno de los extractos vegetales en la composición está en el intervalo de 0,01-10 %.

35 Según algunas realizaciones, la concentración de cada uno de los extractos vegetales en la composición está en el intervalo de 0,5-2 %.

Según algunas realizaciones, la concentración de cada uno de los extractos vegetales en la composición es de 1 %.

Según algunas realizaciones, la concentración de uno de los extractos vegetales en la composición está en el intervalo de 0,01-10 %.

40 Según algunas realizaciones, la concentración de uno de los extractos vegetales en la composición está en el intervalo de 0,5-2 %.

Según algunas realizaciones, la concentración de uno de los extractos vegetales en la composición es de 1 %.

Según algunas realizaciones, el extracto vegetal de *Ailanthus altissima* comprende al menos alrededor de 0,01 % de Ailantona.

45 Según algunas realizaciones, el extracto vegetal de *Ailanthus altissima* consiste en extracto vegetal de *Ailanthi radices*.

Según algunas realizaciones, el extracto vegetal de *Ailanthi radices* es un extracto polar. Según algunas realizaciones, el extracto vegetal de *Ailanthi radices* se purifica de forma adicional utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés).

Según algunas realizaciones, el extracto vegetal comprende un extracto vegetal acuoso. Según algunas

- realizaciones, el extracto vegetal acuoso se purifica de forma adicional utilizando una cromatografía en resina, que puede comprender una resina macroporosa.
- Según algunas realizaciones, la composición no comprende una beta-defensina. Según algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica y comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 5 Según algunas realizaciones, la composición es una composición cosmética y comprende un vehículo o diluyente cosméticamente aceptable. El vehículo o diluyente cosméticamente aceptable se puede formular en una forma seleccionada del grupo que consiste en una crema, un gel, un pulverizador, una loción, un ungüento, un aceite, un lavado, un champú, un jabón y un pulverizador.
- 10 Según la invención, la infección se asocia a una enfermedad atópica, una dermatitis de contacto, una dermatitis numular, una dermatitis por radiación, una quemadura, un eccema no atópico o una escara de decúbito.
- Según algunas realizaciones de la invención, el sujeto es un humano. Según algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz es para aumentar la expresión de una beta-defensina humana en una célula del sujeto.
- Según algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz comprende una actividad antimicrobiana.
- 15 Según algunas realizaciones, el aplicador está en una forma seleccionada del grupo que consiste en un vendaje adhesivo, un vendaje no adhesivo, una toallita, una gasa y una almohadilla.
- Según algunas realizaciones, la forma de dosificación unitaria comprende extracto vegetal de *Ailanthus altissima* a una concentración de alrededor de 0,5-2 % peso/peso.
- Según algunas realizaciones, la forma de dosificación unitaria comprende, además, extracto vegetal de *Glycyrrhiza Glabro* a una concentración de alrededor de 0,5-2 % peso/peso.
- 20 Según algunas realizaciones, la forma de dosificación unitaria comprende, además, extracto vegetal de *Galla rhois gallnut* a una concentración de alrededor de 0,5-2 % peso/peso.
- Según algunas realizaciones, la forma de dosificación unitaria comprende extracto vegetal de *Rheum palmatum* a una concentración de alrededor de 0,5-2 % peso/peso.
- 25 Según algunas realizaciones, la forma de dosificación unitaria comprende extracto vegetal de *Scutellaria baicalensis* a una concentración de alrededor de 0,5-2 % peso/peso.
- Según algunas realizaciones, la concentración del extracto vegetal es de 1 % peso/peso.
- Según algunas realizaciones, la concentración de la Ailantona es de alrededor de 0,01-1 % peso/peso.
- Según algunas realizaciones, la forma de dosificación unitaria está en una forma seleccionada del grupo que consiste en un vendaje adhesivo, un vendaje no adhesivo, una toallita, una gasa y una almohadilla.
- 30 Según algunas realizaciones, la composición, sistema de suministro o unidad de dosificación unitaria comprende, además, un factor seleccionado del grupo que consiste en un componente de matriz extracelular, un factor de crecimiento, una hormona, un factor angiogénico, un factor de coagulación, un inhibidor de citocina, un inhibidor de quimiocina, una enzima, un neurotransmisor, una vitamina, un carbohidrato, un hierro, un quelante de hierro, un ácido graso, un agente antimicrobiano, un antibiótico, un esteroide y un aminoácido.
- 35 Según algunas realizaciones, la composición se administrará de forma crónica. Según algunas realizaciones, la composición se administrará al menos una vez al día.
- Según algunas realizaciones, la composición se administrará durante al menos 21 días.
- Según algunas realizaciones de la invención, la *Ailanthus altissima* consiste en *Ailanthi radices*.
- 40 Según algunas realizaciones de la invención, el ingrediente activo se selecciona del grupo que consiste en Ailantona, Mersosina, Toosendanina, Ginsenoide General, Ácido gálico, Liquiritina, Praeruptorina A, Ácido tánico y Silibina.
- Según algunas realizaciones, la planta comprende *Ailanthi altissima* y el ingrediente activo comprende Ailantona.
- Según algunas realizaciones, la célula comprende una célula queratinocito.
- Según algunas realizaciones, la composición cosmética comprende, además, un humectante y un emoliente.
- 45 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos o científicos que se utilizan en la presente memoria tienen el mismo significado que normalmente les atribuye el experto en la técnica a quien concierne esta invención. Si bien pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para

poner en práctica o evaluar las realizaciones de la invención, a continuación, se describen métodos o materiales de ejemplo. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no se pretende que sean necesariamente limitantes.

5 Breve descripción de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente memoria, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica a continuación a los dibujos de forma detallada, se resalta que la información que se muestra se proporciona a modo de ejemplo y solamente a efectos de describir las realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción junto con los dibujos hará evidente para los expertos en la técnica cómo poner en práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

La Figura 1 es un gráfico lineal que representa la curva típica para la beta-defensina 3 humana y GAPDH con ADNc diluido de forma sucesiva.

La Figura 2 es un gráfico lineal que representa el análisis de PCR en tiempo real de la beta-defensina 3 humana, utilizando queratinocitos HaCaT no tratados (n = 3).

Las Figuras 3A-D son gráficos que representan porcentajes de viabilidad celular según se mide mediante el ensayo MTS. Se incubaron células KU812 con extractos herbarios (1 %, 0,1 % o 0,01 % según se indica) durante 24 h. Se midió la fisetina a concentraciones de 100, 10 y 1 μ M. Las placas se leyeron a 490 nm y la viabilidad celular se calculó como un porcentaje de las células no tratadas (100 % de viabilidad) \pm DT. La identificación del material de prueba es tal como se indica en la Tabla 1, más adelante.

Las Figuras 4A-G son gráficos que representan la inhibición de la expresión de IL-13 mediante extractos herbarios en células KU812. Las células KU812 se trataron con los extractos herbarios según se describe en el Ejemplo 1, en la presente memoria más adelante, y los sobrenadantes del cultivo celular luego se sometieron a ensayo para determinar la expresión de IL-13. Los valores se presentan como la concentración media de IL-13 (pg/ml) \pm DT. Materiales de prueba de la Figura 4A: 1 *Glycyrrhiza glabra*; 2 - *Saposhnikovia divaricata*; 3 - Raíz *Tripterygii wilfordii*; 4 - *Cimicifuga racemosa*; 5 - *Celosia argentea*; 6 - Raíz de Coptis. Concentraciones medidas: Concentración 1 - 1 % (para la muestra 6 - 0,05 %), Concentración 2 - 0,1 % (para la muestra 6 - 0,01 %), Concentración 3 - 0,01 % (para la muestra 6 - 0,001 %); Materiales de prueba de la Figura 4B: 7 - *Salviae miltiorrhizae*; 8 - hojas de *Saururus Chinensis*; 9 - *Calendula officinalis*; 10 - Gentiana; 11 *Mentha aquatica L*; 12 - *Taraxacum officinale*. Concentraciones medidas: Concentración 1 - 1 % (para la muestra 10 - 0,1 %), Concentración 2 - 0,1 % (para la muestra 10 - 0,01 %), Concentración 3 - 0,01 % (para la muestra 10 - 0,001 %); Materiales de prueba de la Figura 4C: 13 - Fruta de ciprés de verano; 14 - *Anemarrhena asphodeloides*; 15 - *Stellaria dichotoma L. var.* Raíz de llantén menor; 16 - *Fritillaria verticillata*; 17 - *Silybum marianum*; 18 - *Actinidia polygama*. Concentraciones medidas: Concentración 1 - 1 % (para la muestra 15 - 0,1 %), Concentración 2 - 0,1 % (para la muestra 15 - 0,01 %), Concentración 3 - 0,01 % (para la muestra 15 - 0,001 %); Materiales de prueba de la Figura 4D: 19 - Phellodendron; 20 - *Sapindus mukurossi*; 21 - *Radix Sophora flavescens*; 22 - *Sanguisorba officinalis*; 23 - Fructus Cnidii; 24 - *Camelia japonica*. Concentraciones medidas: Concentración 1 — 1 % (por ejemplo 19 - 0,05 %, muestra 20 - 0,01 %, muestra 21 - 0,5 %), Concentración 2 - 0,1 % (para la muestra 19 - 0,01 %, muestra 20 - 0,005 %), Concentración 3 - 0,01 % (para la muestra 19, 20 - 0,001 %). Materiales de prueba de la Figura 4E: 25 - *Scutellaria baicalensis*; 26 - *Rheum palmatum*; 27 - Chrysanthemum; 28 - Portulaca; corteza de peonía; B - *Angelica sinensis*. Concentraciones medidas: Concentración 1 — 1 % (por ejemplo 27 y 28 - 0,1 %), Concentración 2 - 0,1 % (por ejemplo 27 y 28 - 0,05 %), Concentración 3 - 0,01 %. Materiales de prueba de la Figura 4F: C - *Astragalus membranaceus*; D - *Evodia rutaecarpa*; E - *Polygonum cuspidatum*; F - *Liriope platyphylla*; G - *Smilacis glabrae*; H - *Curcuma longa*. Concentraciones medidas: Concentración 1 - 1 % (por ejemplo, D y H 0,1 %, muestras E y F - 0,5 %), Concentración 2 - 0,1 % (por ejemplo, D - 0,05 %, muestra H - 0,01 %), Concentración 3 - 0,01 % (muestra H - 0,001 %). Materiales de prueba de la Figura 4G: I - Indigo; J - *Semen Hydnocarpus hainanensis*. Concentraciones medidas: I y J - 1 %, 0,1 % y 0,01 %. Fisetina: 100 μ M, 10 μ M y 1 μ M.

La Figura 5 es un gráfico lineal que representa los extractos herbarios números 136 y 137 que condujeron a un aumento significativo en la expresión de hBD-3 (véanse las flechas).

La Figura 6 es un gráfico lineal que representa el extracto herbario n. ° 171 que condujo a un aumento significativo en la expresión de hBD-3.

La Figura 7 es un gráfico lineal que representa el extracto herbario n. ° 194 que condujo a un aumento significativo en la expresión de hBD-3.

La Figura 8 es un gráfico lineal que representa los extractos herbarios números 232 y 246 que condujeron a un aumento significativo en la expresión de hBD-3.

La Figura 9 es un gráfico lineal que representa el extracto herbario n. ° 362 que condujo a un aumento significativo

en la expresión de hBD-3.

La Figura 10 es un gráfico de barras que representa el efecto estimulante de seis extractos herbarios (según se indican) sobre la expresión de hBD-3.

5 La Figura 11 es un gráfico de barras que representa la comparación de la estimulación de hBD-3 mediante hierbas (según se indican) extraídas con agua caliente (AC), 50 % de EtOH y 50 % de MtOH.

10 La Figura 12 es un gráfico de barras que representa porcentajes de viabilidad celular según se mide mediante el ensayo MTS. Se incubaron células KU812 con extractos herbarios (0,3 %) durante 24 h. Las placas se leyeron a 490 nm y la viabilidad celular se calculó como un porcentaje de las células no tratadas (100 % de viabilidad) \pm DT. Cabe señalar que las muestras 4 y B - el material de prueba puede haber hecho reacción con la disolución de MTS. El examen microscópico no mostró ninguna señal de proliferación celular ni citotoxicidad excesivas. La identificación del material de prueba es la siguiente: 1. *Glycyrrhiza glabra*; 2. *Cimicifuga racemosa*; 3. *Silybum marianum*; 4. *Sanguisorbae officinalis*; A. *Ailanthus altissima*; B. *Galla rhois gallnut*; C. *Peucedanum praeruptorum*.

15 La Figura 13 es un gráfico de barras que representan la inhibición de la expresión de IL-13 mediante extractos herbarios en células KU812. Las células KU812 se trataron con los extractos herbarios (0,3 %) según se describe en el Ejemplo 1, más adelante en la presente, y los sobrenadantes del cultivo celular luego se sometieron a ensayo para determinar la liberación de IL-13. Los valores se presentan como la concentración media de IL-13 (pg/ml) \pm DT. La identificación del material de prueba es la siguiente: 1. *Glycyrrhiza glabra*; 2. *Cimicifuga racemosa*; 3. *Silybum marianum*; 4. *Sanguisorbae officinalis*; A. *Ailanthus altissima*; B. *Galia rhois gallnut*; C. *Peucedanum praeruptorum*.

20 Las Figuras 14A-E son gráficos que representan el efecto de estimulación de los extractos herbarios sobre la beta-defensina 3 humana (hBD-3) según se midió mediante RT-PCR. Cada extracto herbario se midió para determinar el efecto estimulante de la betadefensina [Figuras 14A-D: La Figura 14A muestra el efecto directo de *Glycyrrhiza glabra* (n. ° 1) sobre la expresión de hBD3. La Figura 14B muestra el efecto directo de *Cimicifuga racemosa* (n. ° 2) sobre la expresión de hBD3. La Figura 14C muestra el efecto directo de *Silybum marianum* (n. ° 3) sobre la expresión de hBD3 y la Figura 14D muestra el efecto directo de *Sanguisorbae officinalis* (No. 4) sobre la expresión de hBD3]; la Figura 14E resume los resultados de la actividad de estimulación de los extractos herbarios sobre la expresión de hBD-3. La identificación del material de prueba es la siguiente: 1. *Glycyrrhiza glabra*; 2. *Cimicifuga racemosa*; 3. *Silybum marianum*; 4. *Sanguisorbae officinalis*.

30 Las Figuras 15A-C son gráficos de barras que representan el efecto sinérgico entre los extractos herbarios. Los extractos herbarios se midieron para determinar su efecto sinérgico sobre la inhibición de IL-13 (células KU812, ELISA) (Figura 15A) o su efecto estimulante de beta-defensina 3 (células HaCaT, RT-PCR) (Figuras 15B-C). Se midieron 4 extractos herbarios para determinar el efecto sinérgico con *Ailanthi radices cortex* al 1 % (Figura 15B) o con (1 %) *Galla Rhois* (Figura 15C). La identificación del material de prueba de la Figura 15A es la siguiente: 1. *Glycyrrhiza glabra*; 2. *Cimicifuga racemosa*; 3. *Silybum marianum*; 4. *Sanguisorbae officinalis*. La identificación del material de prueba de la Figura 15B: 1 % *Ailanthus altissima* con 0,3 %: 1. *Glycyrrhiza glabra*; 2. *Cimicifuga racemosa*; 3. *Silybum marianum*; 4. *Sanguisorbae officinalis*. La identificación del material de prueba de la Figura 15C es la siguiente: 1 % *Galia rhois gallnut* con 0,3 % de: 1. *Glycyrrhiza glabra*; 2. *Cimicifuga racemosa*; 3. *Silybum marianum*; 4. *Sanguisorbae officinalis*.

40 La Figura 16 es un gráfico de barras que representa la actividad inhibidora de IL-13 de los extractos herbarios antes (A-C) y después (1-3) de la cromatografía en resina. Los extractos herbarios se midieron en 0,3 % para determinar su capacidad para inhibir IL-13. La identificación del material de prueba antes y después de la optimización por cromatografía, respectivamente: A, 1- *Ailanthus altissima*; B, 2- *Galia rhois gallnut*; C, 3- *Peucedanum praeruptorum*.

Las Figuras 17A-B son fotografías que representan la actividad antimicrobiana del extracto de *Galla Rhois* (n. ° 232). La Figura 17A representa la actividad antimicrobiana contra *E. coli* resistente a ampicilina; y la Figure 17B representa la actividad antimicrobiana contra *S. aureus*.

45 La Figura 18 es un gráfico lineal que representa la reducción SCORAD en el tiempo en sujetos tratados con vehículo (representado por diamantes) y tratamiento (la composición comprendía *Sanguisorba officinalis* y *Ailanthus altissima*, representada por cuadrados) (evaluados en los días 0, 7, 14 y 21).

La Figura 19 es un gráfico lineal que representa el efecto de los componentes SCORAD (extensión, intensidad y subjetivo) sobre la puntuación total en el grupo tratado con vehículo (en los días 7, 14 y 21).

50 La Figura 20 es un gráfico lineal que representa el efecto de los componentes SCORAD (extensión, intensidad y subjetivo) sobre la puntuación total en el grupo con tratamiento (la composición comprende *Sanguisorba officinalis* y *Ailanthus altissima*, en los días 7, 14 y 21).

La Figura 21 es un gráfico lineal que representa una comparación entre los grupos con vehículo y tratamiento: reducción de intensidad en el tiempo (evaluados en los días 0, 7, 14 y 21).

55 La Figura 22 es un gráfico lineal que representa una comparación entre los grupos con vehículo y tratamiento:

reducción de puntuaciones subjetivas en el tiempo (evaluados en los días 0, 7, 14 y 21).

La Figura 23 es un gráfico de barras que representa el porcentaje de pacientes con síntomas mejorados en el grupo tratado con vehículo (en los días 7, 14 y 21).

5 La Figura 24 es un gráfico de barras que representa el porcentaje de pacientes con síntomas mejorados en el grupo tratado con tratamiento (en los días 7, 14 y 21).

La Figura 25 es un gráfico de barras que representa el porcentaje de pacientes con síntomas mejorados en los grupos tratados con tratamiento y vehículo después de 21 días de tratamiento.

La Figura 26 es un gráfico de barras que representa la reducción del prurito y la privación del sueño en el grupo tratado con vehículo (en los días 7, 14 y 21).

10 La Figura 27 es un gráfico de barras que representa la reducción del prurito y la privación del sueño en el grupo tratado con tratamiento (en los días 7, 14 y 21).

La Figura 28 es un gráfico de barras que representa una mejor en la valoración subjetiva del prurito y el insomnio después de 21 días en los grupos tratados con vehículo y tratamiento.

15 La Figura 29 es un gráfico de barras que representa la reducción SCORAD en DA grave y no grave después de 21 días en los grupos tratados con vehículo y tratamiento.

La Figura 30 es un gráfico de barras que representa la hidratación cutánea y la pérdida de agua transepitelial (TEWL, por sus siglas en inglés) en los grupos tratados con vehículo y tratamiento.

La Figura 31 es un diagrama de flujo que ilustra los fraccionamientos en serie de *Ailanthi radiceis*.

20 Las Figuras 32A-E son gráficos lineales que representan el efecto del extracto con agua, el extracto con alcohol butílico y el extracto con alcohol etílico de *Ailanthi radiceis* sobre la beta-defensina 3 humana y GAPDH (gen de control de expresión interno) de las células HaCaT. La Figura 32A representa el efecto de 10 µl de agua (testigo) sobre la expresión de DEF3 y GAPDH; la Figura 32B representa el efecto de 10 µl de extracto acuoso de *Ailanthi radiceis* sobre la expresión de DEF3 y GAPDH; la Figura 32C representa el efecto de 10 µl de DMSO (testigo) sobre la expresión de DEF3 y GAPDH; la Figura 32D representa el efecto de 10 µl de extracto con acetato de etilo de *Ailanthi radiceis* sobre la expresión de DEF3 y GAPDH; y la Figura 32E representa el efecto de 10 µl del extracto con alcohol butílico de *Ailanthi radiceis* butilo sobre la expresión de DEF3 y GAPDH.

25 La Figura 33 es un cromatograma obtenido mediante HPLC con gradiente del extracto con alcohol butílico de *Ailanthi radiceis*.

30 La Figura 34 es un gráfico lineal que representa el análisis de PCR en tiempo real de la expresión de DEF3 después del tratamiento con cada una de las 25 fracciones.

La Figura 35 es un espectro de RMN de compuesto estimulante de DEF3 de extracto de *Ailanthi radiceis*.

La Figura 36 es un espectro de RMN de compuesto estimulante de DEF3 de extracto de *Ailanthi radiceis*.

La Figura 37 es un espectro de RMN de compuesto estimulante de DEF3 de extracto de *Ailanthi radiceis*.

La Figura 38 es un espectro de RMN de compuesto estimulante de DEF3 de extracto de *Ailanthi radiceis*.

35 Las Figuras 39A-B son ilustraciones de la estructura del compuesto estimulante de DEF3, ailantona, de extracto de *Ailanthi radiceis*.

Descripción de modalidades específicas de la invención

La presente invención se refiere a extractos vegetales y al uso de estos para el tratamiento o prevención de infecciones, incluidas infecciones secundarias de enfermedades inflamatorias crónicas.

40 Se pueden comprender mejor los principios y el funcionamiento de la presente invención con referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

45 Al poner en práctica la presente invención, los presentes inventores han desarrollado composiciones basadas en extractos herbarios para el tratamiento o prevención de infecciones que incluye la gestión de infecciones secundarias de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como dermatitis atópica (DA), y que son seguras para aplicación a largo plazo. Específicamente, los presentes inventores identificaron extractos herbarios antiinflamatorios que tienen actividad estimulante sobre la expresión de β-defensinas mientras exhiben un efecto inhibitorio sobre las citocinas T cooperadoras 2 (Th2).

Según se muestra más adelante en la presente memoria y en la sección de Ejemplos a continuación, los presentes

inventores han demostrado por primera vez el efecto doble de los extractos herbarios como estimulantes de (β -defensinas y como inhibidores de la producción de IL-13. Los presentes inventores han demostrado de forma específica que los extractos obtenidos de *Sanguisorbae officinalis*, *Ailanthus altissima*, *Galla rhois gallnut*, *Glycyrrhiza Glabra*, *Peucedanum praeruptorum* y *Cimicifuga racemosa* son eficaces para aumentar la expresión de β -defensina mientras reducen la secreción de IL-13 (véanse los Ejemplos 3-4 y 6-7, más adelante en la presente memoria). Los presentes inventores han demostrado, además, el efecto sinérgico de *Sanguisorbae officinalis* con *Ailanthus altissima* o *Galla rhois gallnut* sobre la estimulación de las β -defensinas y la inhibición de la producción de IL-13 (véase el Ejemplo 8, más adelante en la presente memoria). Asimismo, los presentes inventores han demostrado el efecto antibacteriano de *Galla rhois gallnut* contra *S. aureus* y *E. coli* resistente a ampicilina (véase el Ejemplo 9, más adelante en la presente memoria). Además, los presentes inventores han ilustrado en un ensayo clínico la eficacia terapéutica de una composición cosmética que comprende extracto de raíz de *Sanguisorbae officinalis*, extracto de *Ailanthus altissima* y un vehículo cosmético recientemente formulado para la dermatitis atópica (véase el Ejemplo 10, más adelante en la presente memoria). Los resultados del ensayo clínico han demostrado una mejoría significativa en la intensidad de los parámetros objetivos y subjetivos (véanse las Figuras 21-22), así como en la intensidad de los síntomas individuales y en la cantidad de pacientes que padece los síntomas (véase la Tabla 15 y la Figura 25) en sujetos afectados de dermatitis atópica moderada a grave que recibieron tratamiento con la composición que comprende extracto de raíz de *Sanguisorbae officinalis* y extracto de *Ailanthus altissima* (grupo de tratamiento) y vehículo. La actividad superior del grupo de tratamiento (42 %) con respecto al vehículo (21 %) se demostró especialmente en sujetos afectados de dermatitis atópica grave (SCORAD > 50, véase la Figura 29). Los síntomas característicos de la dermatitis atópica grave tales como edema (50 % con respecto a 27 %), exudación (86 % con respecto a 39 %), excoriación (53 % con respecto a 23 %) y liquenización (53 % con respecto a 28 %) mejoraron en gran medida en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de vehículo (Tabla 15).

Los resultados indicados anteriormente demostraron de forma clara el efecto superior del grupo de tratamiento sobre los síntomas de la DA, en particular sobre los síntomas relacionados con la DA grave y con infecciones secundarias. Se ha demostrado en el pasado que la densidad de *S. aureus* puede alcanzar hasta 10^7 unidades formadoras de colonias/ cm^2 sin signos clínicos de infección [véase, p. ej., Goh et al. Int J Dermatol. (1997) 36(9):6537]. Por lo tanto, aunque no se observaron signos clínicos de infección en los sujetos que conformaron los grupos del ensayo clínico, muy probablemente existía colonización bacteriana en al menos los pacientes graves (SCORAD >50). En conjunto, los actuales resultados confirman la capacidad de los dos extractos herbarios (es decir, *Sanguisorba officinalis* y *Ailanthus altissima*) agregados a la loción vehículo para tratar infecciones secundarias de DA mediante la estimulación de beta-defensinas y la inhibición de IL-13. La capacidad para aumentar las beta defensinas y reducir las IL-13 proporciona una tecnología de plataforma para el tratamiento de infecciones tales como las asociadas con la inflamación crónica, como es el caso de la DA.

Los presentes inventores han identificado, además, el ingrediente activo dentro de *Ailanthus altissima*, a saber, en la corteza o corteza de raíz de esta, es decir *Ailanthi radices*, que es responsable de la expresión de β -defensina 3 (DEF3), como ailantona (véase el Ejemplo 11 y las Figuras 39A-B, más adelante en la presente memoria). Juntos, estos resultados confirman el valor terapéutico y cosmético de estos extractos herbarios y combinaciones de estos para el tratamiento y prevención de infecciones.

Por lo tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de extracto vegetal acuoso de *Sanguisorbae officinalis* y un extracto vegetal acuoso de *Ailanthus altissima* para uso en el tratamiento o prevención de una infección cutánea en un sujeto que lo necesita, en donde la infección cutánea es una enfermedad atópica, una dermatitis de contacto, una dermatitis numular, una dermatitis por radiación, una quemadura, un eccema no atópico o una escara de decúbito.

El término «tratar» hace referencia a inhibir, prevenir o detener el desarrollo de una patología (enfermedad, trastorno o afección) y/o provocar la reducción, remisión o regresión de una patología. Los expertos en la técnica entenderán que se pueden utilizar diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una patología y, de forma similar, se pueden utilizar diversas metodologías y ensayos para evaluar la reducción, remisión o regresión de una patología.

El término «infección», según se usa en la presente, hace referencia a una afección médica patológica de una parte o tejido corporal en la que un microorganismo patógeno provoca la posterior inflamación o daño del tejido. Los ejemplos de enfermedades infecciosas que son susceptibles al tratamiento mediante las presentes composiciones incluyen, pero no se limitan a, enfermedades infecciosas crónicas, enfermedades infecciosas subagudas, enfermedades infecciosas agudas, enfermedades víricas, enfermedades bacterianas, enfermedades protozoarias, enfermedades parasitarias, enfermedades fúngicas y enfermedades por micoplasma.

Según una realización de la presente invención, la causa de la infección es una bacteria gram-negativo o gram-positiva u otros microbios patógenos que incluyen, pero no se limitan a, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* (p. ej., *Staphylococcus aureus* multirresistente), *Enterococcus faecium* (p. ej., *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina) o la levadura *Candida albicans*.

En la presente invención, la infección es una infección cutánea (p. ej., una herida cutánea). Los ejemplos de infecciones cutáneas susceptibles a tratamiento mediante las presentes composiciones incluyen, pero no se limitan

a, infecciones cutáneas bacterianas provocadas, p. ej., por *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus*, infecciones cutáneas víricas provocadas por, p. ej., virus del herpes simple o virus del herpes zóster, infecciones cutáneas fúngicas e infecciones cutáneas por levaduras.

5 Según una realización específica, la presente invención contempla el tratamiento de heridas infecciosas, tales como las que se producen como infecciones secundarias de la dermatitis atópica.

10 El término «herida», según se usa en la presente memoria, hace referencia en sentido amplio a lesiones de la piel y tejido subcutáneo iniciadas en uno cualquiera de una variedad de modos (p. ej., heridas causadas por un organismo infeccioso) y con características variables. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, hematomas, rasguños, heridas por quemadura, heridas por quemadura solar, heridas por incisión, heridas por escisión, heridas quirúrgicas, fascitis necrotizante, úlceras, úlceras por insuficiencia venosa, úlceras diabéticas, úlceras de decúbito, úlceras aftosas, escaras de decúbito, lesiones, cicatrices, alopecia areata, dermatitis, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de Berloque, dermatitis de la región del pañal, dermatitis dishidrótica, psoriasis, eccema, eritema, verrugas, verrugas anales, pie de atleta, lunares atípicos, carcinoma de células basales, púrpura de Bateman, penfigoide bulloso, candidiasis, condrodermatitis del hélix, nevo de Clark, queilitis herpética, condilomas, quistes, enfermedad de Darier, dermatofibroma, lupus eritematoso discoide, eccema numular, eccema atópico, eccema dishidrótico, eccema de manos, eritema nodoso multiforme, afección de Fordyce, folliculitis queloidea de la nuca, folliculitis, granuloma anular, enfermedad de Grover, miliaria, herpes simple, herpes zóster (culebrilla), hidradenitis supurativa, ronchas, hiperhidrosis, ictiosis, impétigo, queratosis pilosa, queloides, queratoacantoma, liquen plano, liquen plano similar a queratosis, liquen simple crónico, liquen escleroso, papulosis linfomatoide, lupus cutáneo, borreliosis de Lyme, liquen estriado, quistes mixoides, micosis fungoide, molusco contagioso, lunares, hongos de uñas, necrobiosis lipoídica diabética, dermatitis numular, oncosquisis, oncomicosis, pitiriasis liquenoide, pitiriasis rosada, pitiriasis roja pilosa, verrugas plantares, hiedra venenosa, roble venenoso, ponfóllice, pseudofolliculitis de la barba, prurito anal y pitiriasis blanca.

25 Las heridas típicamente se clasifican en uno de cuatro grados dependiendo de la profundidad de la herida: (i) Grado I: heridas que se limitan al epitelio; (ii) Grado II: heridas que se extienden a la dermis; (iii) Grado III: heridas que se extienden al tejido subcutáneo; y (iv) Grado IV (o heridas de todo el espesor): heridas con exposición del hueso (p. ej., un punto de presión óseo como el trocánter mayor o el sacro).

30 La expresión «herida de espesor parcial» utilizada en la presente memoria hace referencia a heridas que abarcan los Grados I-III; los ejemplos de heridas de espesor parcial incluyen heridas por quemadura, escaras de decúbito, úlceras por insuficiencia venosa y úlceras diabéticas.

La expresión «herida profunda» que se utiliza en la presente memoria pretende incluir heridas de Grado III y Grado IV.

La expresión «herida crónica» que se utiliza en la presente memoria hace referencia a una herida que no se ha curado en treinta días.

35 El término «curación» en relación con una herida hace referencia al proceso de reparar una herida, tal como la formación de una cicatriz.

En una realización específica, las composiciones de algunas realizaciones de la presente invención incluyen promover, es decir, acelerar el proceso de curación.

40 Según se usa en la presente, el término «prevenir» hace referencia a evitar que se presente una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto. En algunos casos, el sujeto puede estar en riesgo de desarrollar la enfermedad, pero todavía no se ha diagnosticado que padece la enfermedad.

45 Los sujetos típicos que se pueden tratar según este aspecto de la presente invención incluyen mamíferos, tales como humanos o animales domesticados que incluyen, pero no se limitan a, caballos (es decir, equinos), ganado, cabras, ovejas, cerdos, perros, gatos, camellos, alpacas, llamas y yaks, machos o hembras, en cualquier edad que necesitan el tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa.

La presente invención contempla tratar todos los tipos de infecciones cutáneas, incluidas infecciones primarias e infecciones secundarias que se presentan como resultado de enfermedades inflamatorias (p. ej., enfermedades inflamatorias crónicas).

50 Según se usa en la presente, la frase «enfermedad inflamatoria crónica» hace referencia a cualquier afección médica que se caracteriza por inflamación persistente.

55 Los ejemplos de afecciones médicas asociadas a inflamación incluyen, pero no se limitan a, enfermedades alérgicas, enfermedades respiratorias inflamatorias, enfermedades pulmonares inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades neoplásicas inflamatorias, enfermedades relacionadas con trasplantes inflamatorias, enfermedades degenerativas inflamatorias, lesiones inflamatorias, enfermedades orales inflamatorias, afecciones oculares inflamatorias, enfermedades de la piel inflamatorias, enfermedades asociadas a

- 5 hipersensibilidad, enfermedades cardiovasculares inflamatorias, enfermedades glandulares inflamatorias, enfermedades gastrointestinales inflamatorias, enfermedades cutáneas inflamatorias, enfermedades hepáticas inflamatorias, enfermedades neurológicas inflamatorias, enfermedades musculoesqueléticas inflamatorias, enfermedades renales inflamatorias, enfermedades sistémicas inflamatorias, enfermedades del tejido conjuntivo inflamatorias, tumores inflamatorios, necrosis o enfermedades relacionadas con implantes inflamatorias.
- 10 Los ejemplos de enfermedades alérgicas incluyen, pero no se limitan a, asma, miliaria, urticaria, una alergia al polen, una alergia a ácaros del polvo, una alergia a veneno, una alergia cosmética, una alergia al látex, una alergia química, una alergia a fármaco, una alergia a picadura de insecto, una alergia a caspa de animales, una alergia a planta urticante, una alergia a hiedra venenosa, choque anafiláctico, anafilaxia, inflamación alérgica de las vías aéreas superiores y alergia alimentaria.
- Los ejemplos de enfermedades pulmonares inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, asma, asma alérgica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y bronquitis.
- Las enfermedades respiratorias inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, infección respiratoria aguda (provocada, p. ej., por *Chlamydomphila pneumonia*).
- 15 Las afecciones oculares inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, exposición a lente de contacto (provocada, p. ej., por *P. aeruginosa keratitis*).
- Los ejemplos de enfermedades orales inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, lesiones ulcerosas.
- 20 Los ejemplos de hipersensibilidades incluyen, pero no se limitan a, hipersensibilidad Tipo I, hipersensibilidad Tipo II, hipersensibilidad Tipo III, hipersensibilidad Tipo IV, hipersensibilidad inmediata, hipersensibilidad mediada por anticuerpo, hipersensibilidad mediada por complejo inmunitario, hipersensibilidad mediada por linfocitos T, hipersensibilidad de tipo retardada, hipersensibilidad mediada por linfocitos T cooperadores, hipersensibilidad mediada por linfocitos T citotóxicos, hipersensibilidad mediada por linfocitos TH1 e hipersensibilidad mediada por linfocitos TH2.
- 25 Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, enfermedad oclusiva, aterosclerosis, infarto de miocardio, trombosis, granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki, enfermedad autoinmunitaria anti-factor VIII, vasculitis de vasos pequeños necrotizante, poliangeítis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrotizante focal inmunonegativa, glomerulonefritis crescénica, síndrome antifosfolípido, insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpo, púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica autoinmunitaria, autoinmunidad cardíaca, enfermedad de Chagas y autoinmunidad anti-linfocitos T cooperadores.
- 30 Los ejemplos de enfermedades glandulares inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, enfermedad pancreática y diabetes Tipo I.
- Los ejemplos de enfermedades gastrointestinales inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, colitis, ileitis, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria crónica, síndrome intestinal inflamatorio, enfermedad intestinal inflamatoria crónica, enfermedad celíaca, una úlcera, una úlcera gástrica, una úlcera péptica, una úlcera bucal, una úlcera nasofaríngea, una úlcera esofágica, una úlcera duodenal y una úlcera gastrointestinal.
- 35 Los ejemplos de enfermedades cutáneas inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, acné, enfermedad cutánea bullosa autoinmunitaria, pénfigo vulgar, penfigoide bulloso, pénfigo foliáceo, dermatitis de contacto y erupción por fármaco.
- 40 Los ejemplos de enfermedades hepáticas inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis hepática y cirrosis biliar.
- Los ejemplos de enfermedades neurológicas inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y miastenia grave.
- 45 Los ejemplos de enfermedades del tejido conjuntivo inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, miositis autoinmunitaria, síndrome de Sjogren primaria, enfermedad de músico liso autoinmunitaria, miositis, tendinitis, una inflamación de ligamento, condritis, una inflamación de articulación, una inflamación sinovial, síndrome del túnel carpiano, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, una inflamación esquelética, una enfermedad autoinmunitaria del oído y una enfermedad autoinmunitaria del oído interno.
- 50 Los ejemplos de enfermedades renales inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, nefritis intersticial autoinmunitaria o cáncer renal.
- Los ejemplos de enfermedades sistémicas inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, choque séptico, síndrome de choque tóxico y caquexia.
- Los ejemplos de enfermedades relacionadas con trasplantes inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, rechazo de

injerto, rechazo de injerto crónico, rechazo de injerto subagudo, rechazo de injerto agudo, rechazo de injerto hiperagudo y enfermedad de injerto contra hospedador.

Los ejemplos de tumores inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, tumores malignos, tumores benignos, tumores sólidos, tumores metastásicos y tumores no sólidos.

- 5 Los ejemplos de lesiones inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, una abrasión, un hematoma, un corte, una herida por punción, una laceración, una herida por impacto, una conmoción, a contusión, una quemadura térmica, una congelación, una quemadura química, una quemadura solar, una desecación, una quemadura por radiación, una quemadura por radiactividad, una inhalación de humo, un músculo desgarrado, un tirón muscular, un tendón desgarrado, un tirón de tendón, un tirón de ligamento, un ligamento desgarrado, un hiperextensión, un cartílago desgarrado, una fractura ósea, un nervio pinzado y una herida de bala.

Los ejemplos de enfermedades de la piel inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, un eccema cutáneo, una úlcera cutánea, una escara/úlcer de decúbito, una lesión, una (p. ej., dermatitis atópica, una dermatitis ocupacional), una hiedra venenosa, un acné, una rosácea y una miliaria.

- 15 Según una realización de la presente invención, la enfermedad inflamatoria crónica es una enfermedad atópica, una dermatitis de contacto, una dermatitis numular, una dermatitis por radiación, una quemadura, un eccema no atópico o una escara de decúbito.

Según una realización específica de la presente invención, la enfermedad inflamatoria crónica es dermatitis atópica (DA).

- 20 Independientemente de la indicación, se puede administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende el extracto vegetal o una forma de dosificación unitaria que la comprende.

Según se usa en la presente memoria, la expresión «extracto vegetal» hace referencia a cualquier extracto obtenible de una planta o cualquier porción de esta. Típicamente, el extracto vegetal comprende el o los ingredientes activos de la planta.

- 25 Por lo tanto, el extracto vegetal se puede obtener del fruto, de la cáscara o corteza de la fruta, las semillas, la corteza, las hojas, las raíces, el rizoma, la corteza de la raíz o el tallo de una planta o una combinación de estos.

- Los extractos vegetales de la presente invención se obtienen de *Sanguisorbae officinalis* y *Ailanthus altissima*, pero se pueden obtener adicionalmente de las plantas *Cimicifuga racemosa*, *Galla rhois gallnut*, *Glycyrrhiza Glabra* (Regaliz), *Peucedanum praeruptorum*, *Sanguisorbae officinalis.*, *Silybum marianum*, *Saposhnikovia divaricata*, *Radix Tripterygii wilfordii*, *Celosia argentea*, Raíz de Coptis, *Radix Salviae miltiorrhizae*, *Saururus Chinensis* (p. ej. Hojas), *Calendula officinalis*, *Gentian*, *Mentha aquatica* L, Dandelion Raíz/ *Taraxacum officinale*, Fruto de ciprés de verano, *Anemarrhena asphodeloides*, raíz de *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata*, *Fritillaria verticillata* , *Actinidia polygama*, *Phellodendron amurense*, *Sapindus mukurossi*, *Radix Sophora flarescents*, *Cnidium monnieri*, *Camelia japonica*, *Scutellaria baicalensis*, *Rheum palmatum*, *Chrysanthemum indicum*, *Portulaca oleracea*, corteza de peonía, *Angelica sinensis*, raíz de *Astragalus membranaceus*, fruto de *Evodia rutaecarpa*, *Polygonum cuspidatum*, rizoma de *Smilax glabra*, *Curcuma longa*, Indigo naturalis, *Semen Hydnocarpi hainanensi*, *Tripterygii wilfordii*, *Salviae miltiorrhizae*, *Camelia japonica*, *Scutellaria baicalensis*, *Rheum palmatum*, *Peonia suffruticosa*, *Rubi fructus*, *Lysimachiae foenumgraeci herba*, *Ailanthi radice cortex*, *Peucedani radix*, *Terminariae fructus*, *Coptidis rhizome* y *Albiziae cortex*.

Según una realización de la invención, el extracto vegetal es un extracto acuoso.

- 40 Según una realización específica, el extracto vegetal se obtiene de una raíz de *Sanguisorba Officinalis*.

Según una realización, el extracto vegetal se obtiene de la corteza o la corteza de la raíz de *Ailanthus altissima* (es decir, *Ailanthi Cortex*). Por lo tanto, según otra realización, el extracto vegetal de *Ailanthus altissima* consiste en extracto vegetal de *Ailanthi radice*.

Según una realización de la presente invención, un extracto vegetal adicional se obtiene de *Galia rhois gallnut*.

- 45 Según una realización de la presente invención, un extracto vegetal adicional se obtiene de *Glycyrrhiza Glabra*.

Según una realización de la presente invención, un extracto vegetal adicional se obtiene de *Rheum palmatum*, tal como una raíz de *Rheum palmatum*.

Según una realización de la presente invención, un extracto vegetal adicional se obtiene de *Scutellaria baicalensis*, tal como una raíz de *Scutellaria baicalensis*.

- 50 Según una realización de la presente invención, un extracto vegetal adicional se obtiene de *Peucedanum praeruptorum*.

Según una realización de la presente invención, un extracto vegetal adicional se obtiene de *Cimicifuga racemosa*.

También se contemplan determinadas combinaciones. Como las que se indican más adelante.

Los extractos vegetales se pueden tratar adicionalmente para purificar los ingredientes activos tales como los que tienen actividad antiinfecciosa. Los métodos para determinar la actividad antibacteriana o la actividad bactericida se conocen en la técnica e incluyen, sin limitación, ensayos antimicrobianos de difusión en papel, difusión en disco, dilución en caldo y dilución en agar (algunos de estos se indican más adelante en la presente memoria y en la sección de ejemplos a continuación). Los ingredientes activos presentes en los extractos vegetales de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, Ailantona, Mersosina, Toosendanina, Ginsenoide General, Ácido gálico, Liquiritina, Praeruptorina A, Ácido tánico y Silibina. Los ingredientes activos se pueden purificar a partir de extractos vegetales o utilizarse sintéticamente. La concentración se puede determinar mediante los ensayos mencionados anteriormente y los intervalos específicos proporcionados para ailantona más adelante se pueden implementar para otros ingredientes activos.

Según una realización, el ingrediente activo en un extracto vegetal es Ailantona.

Según se usa en la presente memoria, el término «Ailantona» o 11.beta.,20-epoxi-1.beta.,11.alfa.,12.alfa.-trihidroxipicrasa-3,13(21)-dieno-2,16-diona se refiere al compuesto contenido en la corteza del «árbol de cielo» (nombre japonés «Shinju» o «Niwaurushi»; *Ailanthus altissima*, Swingle, Simarubaceae) y sus derivados tales como los descritos en las patentes estadounidenses números 4.665.201 y 4.774.342. El término se refiere a compuestos de origen natural (purificados a partir de la planta) o sintéticos.

Según una realización, cuando la planta comprende *Ailanthi altissima*, el ingrediente activo comprende Ailantona.

Según otra realización, el extracto vegetal de *Ailanthi altissima* comprende al menos alrededor de 0,01 %, al menos alrededor de 0,05 %, al menos alrededor de 0,1 %, al menos alrededor de 0,25 %, al menos alrededor de 0,5 %, al menos alrededor de 1 %, al menos alrededor de 2,5 % o al menos alrededor de 5 % de Ailantona.

Los intervalos contemplados de forma específica para cada uno de los ingredientes activos descritos anteriormente (p. ej., Ailantona incluyen 0,01-5 %, 0,05 -2,5 %, 0,05-1 %, 0,01-1 %).

Según una realización, las composiciones que comprenden Ailantona carecen de materiales de *Ailanthus* tales como celulosa, proteína y otros metabolitos secundarios.

Los extractos vegetales se pueden purificar mediante el uso de un disolvente polar (es decir, un extracto polar) tal como, pero sin limitarse a, agua. Los extractos polares de la presente invención pueden comprender cualquier porcentaje de disolvente polar, incluidos por ejemplo 1 - 10 % de disolvente polar, 10 - 20 % de disolvente polar, 20 - 30 % de disolvente polar, 30 - 40% de disolvente polar, 40 - 50 % de disolvente polar, 50 - 60 % de disolvente polar, 70 - 80 % de disolvente polar, 80 - 90 % de disolvente polar y 90 - 100 % de disolvente polar.

Típicamente, las moléculas hidrófobas tienden a ser no polares y, por lo tanto, prefieren otras moléculas neutras y disolventes no polares, alternativamente, las moléculas hidrófilas tienden a ser polares y disolverse en agua y otras sustancias polares.

Por lo tanto, los extractos vegetales de la presente invención se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica incluido un extracto polar tal como un extracto de agua (acuoso), por ejemplo, véase Swanson RL et al., 2004, Biol. Bull. 206: 161-72).

Independientemente del disolvente para el extracto empleado, los extractos vegetales típicamente se preparan al colocar una muestra de planta (p. ej., hojas, semillas) en un mortero junto con una pequeña cantidad de líquido (p. ej., 10 ml de agua, alcohol o un disolvente orgánico para cada 2 gramos de muestra de planta) y moler la muestra por completo utilizando una maza. Cuando la muestra de planta está completamente molida, el extracto vegetal se separa del material de planta molido a través de centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio catiónico, etc., y el líquido recogido se procesa adicionalmente si es necesario (a través de una columna de concentración, etc.), los ingredientes activos se pueden separar de este extracto a través de cromatografía de afinidad, cromatografía de masas y similares.

Un método de ejemplo, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, para obtener un extracto vegetal de *Ailanthi radialis* comprende colocar la muestra de planta seca (p. ej., corteza o corteza de raíz de *Ailanthus altissima*) en agua hirviendo (p. ej., durante 3 horas) y después liofilizar, de forma opcional, el extracto de agua caliente a -60 °C a presión reducida. A continuación, el extracto liofilizado se puede volver a disolver con un extracto polar tal como H₂O, acetato de etilo (EtOAc) o alcohol butílico (n-BuOH). El extracto vegetal recogido luego se puede procesar adicionalmente si es necesario (a través de una columna de concentración, etc.) y los ingredientes activos se pueden separar de este extracto a través de, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y similares.

El extracto vegetal de la presente invención es un extracto acuoso. Para obtener un extracto vegetal purificado (p. ej.

con niveles reducidos de sales orgánicas o metales pesados o almidón en el extracto vegetal), el extracto vegetal acuoso típicamente se purifica de forma adicional utilizando una cromatografía en resina tal como una resina macroporosa u otros métodos de cromatografía.

- 5 Un método para preparar una composición para tratar o prevenir una infección puede comprender: (a) someter una planta a x 1-10 volúmenes de agua para producir un extracto de la planta; y (b) reducir la cantidad de sales orgánicas o metales pesados o almidón en el extracto vegetal utilizando una resina macroporosa que resulta en un contenido elevado de un ingrediente activo que está presente en el extracto vegetal.

Los extractos vegetales de la presente invención también se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes comerciales tales como, por ejemplo, de Crodarom (Crodarom SAS, Chanac, Francia).

- 10 Las composiciones de la presente invención comprenden diversos extractos vegetales. Por lo tanto, según una realización de la presente invención, la composición comprende un extracto vegetal acuoso de *Sanguisorbae officinalis* y un extracto vegetal acuoso de *Ailanthus altissima*.

Las composiciones también pueden comprender un extracto vegetal acuoso seleccionado de *Galla rhois gallnut*, *Peucedanum praeruptorum* y *Cimicifuga racemosa*.

- 15 Según otra realización de la presente invención, la composición comprende un extracto vegetal de *Sanguisorbae officinalis*, un extracto vegetal de *Ailanthus altissima* y un extracto vegetal de *Glycyrrhiza Glabra*.

Según otra realización de la presente invención, la composición comprende un extracto vegetal de *Sanguisorbae officinalis*, un extracto vegetal de *Ailanthus altissima* y un extracto vegetal de *Galla rhois gallnut*.

- 20 Según otra realización de la presente invención, la composición comprende un extracto vegetal de *Sanguisorbae officinalis* y un extracto vegetal de *Ailanthus altissima*.

Se apreciará que la concentración de cada uno de los extractos vegetales dentro de la composición puede variar. Por lo tanto, una concentración de cada uno de los extractos vegetales dentro de la composición puede estar en el intervalo de alrededor de 0,01 a 10 %, 0,05 a 9 %, 0,1 a 8 %, 0,15 a 7 %, 0,2 a 6 %, alrededor de 0,25 a 5 %, alrededor de 0,3 a 4 %, alrededor de 0,4 a 3 %, alrededor de 0,5 a 2 %, alrededor de 1 a 2 % o alrededor de 0,1 a 1 %.

- 25 Según una realización específica, la concentración del extracto vegetal dentro de la composición es de alrededor de 0,5 a 2 %. Según una realización específica adicional, la concentración del extracto vegetal dentro de la composición es de alrededor de 1 %.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende un extracto vegetal acuoso de *Sanguisorbae officinalis* y Ailantona a una concentración de al menos alrededor de 0,01 % p/p y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 30 Según una realización, la composición que comprende Ailantona comprende, además, un extracto vegetal adicional, tal como, por ejemplo, un extracto vegetal de *Galla rhois gallnut*, un extracto vegetal de *Glycyrrhiza Glabra*, un extracto de raíz de *Rheum Palmatum*, un extracto de fruto de *Cnidium Monnieri* y un extracto de raíz de *Scutellaria baicalensis*.

- 35 Según una realización, la composición que comprende Ailantona comprende, además, Glicirrizato dipotásico.

Según una realización, la composición que comprende Ailantona comprende, además, Glicirrizato dipotásico.

Se apreciará que la concentración de Ailantona dentro de la composición puede variar. Por lo tanto, una concentración de Ailantona dentro de la composición puede estar en el intervalo de alrededor de 0,01 a 10 %, alrededor de 0,01 a 7 %, alrededor de 0,01 a 5 %, alrededor de 0,01 a 3 %, alrededor de 0,01 a 2 %, alrededor de 0,01 a 1 %, alrededor de 0,01 a 0,5 %, alrededor de 0,01 a 0,3 %, alrededor de 0,01 a 0,2 % o alrededor de 0,01 a 0,1 %.

- 40 Según una realización, las composiciones de la presente invención se pueden formular para administración tópica, oral, ocular o pulmonar (p. ej. para inhalación). Más adelante en la presente memoria se describen otras formulaciones y están dentro del alcance de la invención.

Según una realización, las composiciones de la presente invención se pueden formular para administración tópica, oral, ocular o pulmonar (p. ej. para inhalación). Más adelante en la presente memoria se describen otras formulaciones y están dentro del alcance de la invención.

- 45 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar al sujeto tal como están o en una composición farmacéutica o cosmética.

Según se usa en la presente memoria, una «composición farmacéutica o cosmética» se refiere a una preparación de los ingredientes activos descritos en la presente con otros componentes químicos tal como vehículos y excipientes fisiológicamente aceptables. El objetivo de la composición es facilitar la administración de los ingredientes activos (p. ej., extracto vegetal) al sujeto.

- 50 Según se usa en la presente memoria, la expresión «ingrediente activo» hace referencia a las composiciones de extracto vegetal responsables del efecto biológico previsto (es decir, para el tratamiento o prevención de una

infección).

5 Más adelante en la presente memoria, las frases «vehículo fisiológicamente aceptable» y «vehículo farmacéuticamente aceptable», que se pueden utilizar de forma intercambiable, hacen referencia a un vehículo o un diluyente que no provoca irritación significativa al sujeto y no suprime la actividad biológica y propiedades de los ingredientes activos administrados. En estas frases se incluye un adyuvante.

En la presente, el término «excipiente» hace referencia a una sustancia inerte agregada a la composición (composición farmacéutica o composición cosmética) para facilitar de forma adicional la administración de un ingrediente activo de la presente invención.

10 Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en «Remington's Pharmaceutical Sciences», Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Cada una de las composiciones de la presente invención puede comprender los extractos vegetales en una coformulación o en composiciones separadas (p. ej., dos formulaciones, tres formulaciones, etc.). Cuando no están coformuladas, la administración de las composiciones de extracto vegetal se puede llevar a cabo de forma simultánea o secuencial.

15 En cualquier caso, las composiciones se pueden formar para varios tipos de administraciones.

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, suministro oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluidas inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como intratecales, intraventriculares directas, intracardiacas, p. ej., en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

20 Alternativamente, se puede administrar la composición de forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, al inyectar la composición que incluye el ingrediente activo (p. ej., extractos vegetales) y un vehículo fisiológicamente aceptable directamente en una región de tejido de un paciente (p. ej., en la piel sana que rodea a la piel infectada).

25 Las vías de administración adecuadas de las composiciones pueden incluir, por ejemplo, administraciones oculares (p. ej., al ojo), tópicas (p. ej., a un tejido queratinoso, tal como la piel, el cabello, las uñas, el cuero cabelludo), transdérmicas, subdérmicas, pulmonares y orales (por ejemplo, por la boca).

Según una realización, la composición de la presente invención se administra de forma tópica, pulmonar (p. ej., a través de inhalación) oral u ocular.

30 Según se usa en la presente, la frase «administración oral» se refiere a la administración de la composición de la presente invención por la boca, por ejemplo, en forma de un líquido, una disolución, un comprimido, una cápsula o un elixir.

Según se usa en la presente, la frase «administración dérmica» se refiere a aplicar o esparcir la composición de la presente invención sobre la superficie del cuerpo, es decir, piel, cuero cabelludo, cabello, uñas y similares, preferiblemente sobre la superficie afectada por la infección.

35 Según se usa en la presente, la frase «administración transdérmica» se refiere a la administración de las composiciones de la presente invención a través de la piel para una administración sistémica (por ejemplo, a través de parches transdérmicos o mediante implantes transdérmicos). La administración transdérmica se lleva a cabo típicamente cerca del sitio de la infección, sin embargo, la administración transdérmica se puede llevar a cabo en cualquier ubicación anatómica, según lo crea conveniente un experto en la técnica.

40 Según se usa en la presente, la frase «administración subdérmica» se refiere a la administración de las composiciones de la presente invención por debajo de la piel (es decir, completamente dentro de la piel, p. ej., a través de implantes subdérmicos). La administración subdérmica se lleva a cabo típicamente cerca del sitio de la infección, sin embargo, la administración subdérmica se puede llevar a cabo en cualquier ubicación anatómica, según lo crea conveniente un experto en la técnica.

45 Las composiciones de la presente invención se pueden producir mediante procesos conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, elaboración de grageas, pulverización, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

50 Las composiciones para uso según algunas realizaciones de la presente invención se pueden formular de manera convencional utilizando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que se pueden usar cosméticamente o farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración seleccionada.

Para inyección, los ingredientes activos de la composición se pueden formular en disoluciones acuosas, preferiblemente, en tampones fisiológicamente compatibles, tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o sal tampón fisiológica. Para administración transmucosal, en la formulación se utilizan penetrantes adecuados para

la barrera que se desea permear. En general, dichos penetrantes se conocen en la técnica.

Para administración oral, la composición se puede formular fácilmente al combinar los compuestos activos con vehículos (p. ej., vehículos farmacéuticamente aceptables) conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que la composición se formule como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares para la ingesta por vía oral por parte de un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden preparar utilizando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, luego de la adición de auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Dichos excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica; o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido gálico o una sal de estos, tal como alginato de sodio.

Se proporcionan núcleos de grageas con recubrimientos adecuados. A tales efectos, se pueden usar disoluciones de azúcar concentrada, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden agregar tintes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las composiciones que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden agregar estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración seleccionada.

Para administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados de manera convencional.

Para administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para uso según la presente invención se suministran de manera conveniente en forma de una presentación en pulverizador en aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar mediante la provisión de una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un dispensador pueden formularse de manera tal que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

La composición descrita en la presente memoria se puede formular para administración parenteral, p. ej., por inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o recipientes de dosis múltiples, opcionalmente, con un conservante agregado. Las composiciones pueden ser suspensiones, disoluciones o emulsiones en portadores oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

Las composiciones para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones adecuadas para inyección con base de aceite o agua. Los disolventes o portadores lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de disoluciones muy concentradas.

De manera alternativa, el ingrediente activo se puede encontrar en forma de polvo para su constitución antes del uso con un portador adecuado, por ejemplo, disolución con base de agua libre de pirógenos estéril.

Las composiciones de algunas realizaciones de la invención se puede formular también en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales tal como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones adecuadas para uso en el contexto de algunas realizaciones de la invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito previsto.

Según se usa en la presente, la frase «cantidad terapéuticamente eficaz» hace referencia a una cantidad de un

ingrediente activo (es decir, una composición de extracto vegetal o un ingrediente activo de este, según se describió anteriormente) eficaz para prevenir o tratar una infección. La cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la presente invención es también eficaz para reducir la secreción de una citocina tipo Th2 (p. ej. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, etc.) de una célula del sujeto (p. ej. un basófilo, véanse, p. ej., los Ejemplos 3 y 6 de la sección de Ejemplos a continuación). La cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la presente invención es eficaz, además, para aumentar (p. ej., estimular) la expresión de una beta-defensina humana (p. ej., beta-defensina 3 humana) en una célula del sujeto (p. ej. un queratinocito, véanse, p. ej., los Ejemplos 4 y 7 de la sección de Ejemplos a continuación). Además, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la presente invención puede comprender una actividad antibacteriana (p. ej., contra *S. aureus* y *E. coli* resistente a ampicilina, véase, p. ej., el Ejemplo 9 de la sección de Ejemplos a continuación).

Según una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de Ailantona comprende una concentración de al menos alrededor de 0,01 %, al menos alrededor de 0,05 %, al menos alrededor de 0,1 %, al menos alrededor de 0,25 %, al menos alrededor de 0,5 %, al menos alrededor de 1 %, al menos alrededor de 2,5 % o al menos alrededor de 5 %, o un intervalo de alrededor de 0,01 a 10 %, alrededor de 0,01 a 7 %, alrededor de 0,01 a 5 %, alrededor de 0,01 a 3 %, alrededor de 0,01 a 2 %, alrededor de 0,01 a 1 %, alrededor de 0,01 a 0,5 %, alrededor de 0,01 a 0,3 %, alrededor de 0,01 a 0,2 % o alrededor de 0,01 a 0,1 %.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, en especial en vista de la descripción detallada que se proporciona en la presente.

Para cualquier preparación utilizada en el método de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, se puede evaluar una cantidad terapéuticamente eficaz *in-vitro* al someter a ensayo la expresión aumentada (es decir, elevada) de una beta-defensina humana en una célula (p. ej., una línea de queratinocitos que expresan beta-defensina) mediante, p. ej., PCR (p. ej., PCR en tiempo real). Alternativamente, se puede evaluar una cantidad terapéuticamente eficaz *in-vitro* al someter a ensayo la secreción reducida (es decir, disminuida) de una citocina tipo Th2 (p. ej. IL-13) de una célula (p. ej. una línea de basófilos que secretan IL-13) mediante, p. ej., anticuerpos (p. ej. anticuerpos monoclonales específicos para IL-13).

Además, se puede formular una dosis en sistemas de cultivo de tejido (p. ej., sistemas *ex-vivo*) o en modelos animales para lograr una concentración o título deseado. Dicha información se puede utilizar para determinar de manera más precisa las dosis útiles en humanos. Por ejemplo, se puede evaluar una cantidad terapéuticamente eficaz *in-vivo* al determinar el nivel de inflamación antes y después de la administración de la composición en un sujeto afectado por un estado inflamatorio [p. ej., mediante el uso de un análisis de sangre tal como un hemograma completo (CBC, por sus siglas en inglés), mediante observación de las heridas cutáneas, etc.].

La toxicidad y eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo celulares e *in vitro* y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para usar en humanos. La dosificación puede variar en función de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. El médico individual puede elegir la formulación exacta, vía de administración y dosificación en vista de la afección del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl. E et al. (1975), «The Pharmacological Basis of Therapeutics», Ch. 1, p.1.).

Dependiendo de la gravedad de la afección (p. ej., el área, profundidad y grado de la invención) y el grado de respuesta del sujeto al tratamiento, la dosificación puede ser de una única o múltiples administraciones, la duración del tratamiento puede ser de varios días a varias semanas, varios meses o varios años, o hasta que se cure o se logre la disminución de la infección. Alternativamente, las composiciones se administran con el fin de evitar que se produzca una infección en un sujeto en riesgo de desarrollar una infección (p. ej., un sujeto que padece una enfermedad inflamatoria crónica). Las composiciones se pueden administrar durante períodos de tiempo prolongados (p. ej., varios días, varias semanas, varios meses o varios años) para evitar que se produzca una infección.

Según una realización de la presente invención, las composiciones de la presente invención se administran al menos una vez al día. Según otra realización, las composiciones se administran dos veces al día, tres veces al día o más.

Según una realización de la presente invención, la administración se lleva a cabo de forma crónica.

Según otra realización, la administración se lleva a cabo durante al menos alrededor de 10 días, 12 días, 14 días, 16 días, 18 días, 21 días, 24 días, 27 días, 30 días, 60 días, 90 días o más.

La cantidad de una composición que se administrará dependerá, por supuesto, del sujeto en tratamiento, la gravedad de la afección, la manera de administración, la opinión del médico tratante, etc.

Las composiciones de la presente invención se pueden formular como una forma de dosificación unitaria. En esta forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del ingrediente activo, tal

como para una única administración. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación empaquetada, el paquete contiene cantidades específicas de la preparación, por ejemplo, una ampolla, un dispensador, un vendaje adhesivo, un vendaje no adhesivo, una toallita, una toallita para bebés, una gasa, una almohadilla y una almohadilla sanitaria.

- 5 La forma de dosificación unitaria según la descripción de la presente invención puede comprender extracto vegetal acuoso de *Sanguisorbae officinalis* a una concentración de alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso.

La forma de dosificación unitaria según la descripción de la presente invención puede comprender, además, extracto vegetal acuoso de *Ailanthus altissima* a una concentración de alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso.

10 La forma de dosificación unitaria según la descripción de la presente invención puede comprender, además, extracto vegetal de *Glycyrrhiza Glabra* a una concentración de alrededor de 0,5 - 5 % peso/peso, alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso.

15 La forma de dosificación unitaria según la descripción de la presente invención puede comprender, además, extracto vegetal de *Galla rhois gallnut* a una concentración de alrededor de 0,5 - 5 % peso/peso, alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso.

La forma de dosificación unitaria según la descripción de la presente invención puede comprender, además, extracto vegetal de *Rheum palmatum* a una concentración de alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso.

20 La forma de dosificación unitaria según la descripción de la presente invención puede comprender, además, extracto vegetal de *Scutellaria baicalensis* a una concentración de alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso.

La forma de dosificación unitaria según la descripción de la presente invención puede comprender extracto vegetal de *Ailanthus altissima* a una concentración de alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso.

25 La forma de dosificación unitaria según la descripción de la presente invención puede comprender extracto vegetal de *Glycyrrhiza Glabra* a una concentración de alrededor de 0,5 - 5 % peso/peso, alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso.

30 La forma de dosificación unitaria según la descripción de la presente invención puede comprender extracto vegetal de *Galla rhois gallnut* a una concentración de alrededor de 0,5 - 5 % peso/peso, alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso.

La forma de dosificación unitaria según la descripción de la presente invención puede comprender extracto vegetal de *Sanguisorbae officinalis* a una concentración de alrededor de 0,5 - 2 % o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso, extracto vegetal de *Ailanthus altissima* a una concentración de alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso y extracto vegetal de *Glycyrrhiza Glabra* a una concentración de alrededor de 0,5 - 5 % peso/peso, alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso.

35 La forma de dosificación unitaria según la descripción de la presente invención puede comprender extracto vegetal de *Sanguisorbae officinalis* a una concentración de alrededor de 0,5 - 2 % o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso, extracto vegetal de *Ailanthus altissima* a una concentración de alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso y extracto vegetal de *Galla rhois gallnut* a una concentración de alrededor de 0,5 - 5 % peso/peso, alrededor de 0,5 - 2 % peso/peso o según una realización específica alrededor de 1 % peso/peso.

40 La forma de dosificación unitaria según la descripción de la presente invención puede comprender una forma de dosificación unitaria seleccionada del grupo que consiste en forma de dosificación unitaria tópica, oral, pulmonar u ocular que comprende Ailantona a una concentración de al menos alrededor de 0,01 % peso/peso, alrededor de 0,01-1 % peso/peso, alrededor de 0,01-2 % peso/peso, alrededor de 0,01-3 % peso/peso, alrededor de 0,01-4 % peso/peso o alrededor de 0,01-5 % peso/peso.

45 La cantidad de compuesto activo en una dosis unitaria de preparación se puede variar o ajustar según la aplicación específica.

50 Las composiciones de la presente invención, si se desea, pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA (siglas en inglés para Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos), que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica o de plástico, tal como un blíster. El paquete

o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para la administración. El paquete o dispositivo dispensador también puede ir acompañado de una notificación en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuya notificación refleja la aprobación de la agencia de la forma de las composiciones para administración humana o veterinaria. Dicha notificación, por ejemplo, puede incluir una etiqueta aprobada por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos para prescripción de fármacos o de un prospecto de producto aprobado. Las composiciones que comprenden la preparación de la invención formuladas en un vehículo farmacéuticamente aceptable también se pueden preparar, colocar en un recipiente adecuado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada, tal como se detalló anteriormente.

10 Dado que las composiciones de la presente invención se utilizan *in vivo*, las composiciones preferiblemente tienen una pureza elevada y están sustancialmente libres de contaminantes potencialmente dañinos, p. ej., al menos de grado del Instituto Nacional de Alimentos (NF, por sus siglas en inglés), generalmente al menos de grado analítico y, preferiblemente, al menos de grado farmacéutico. En la medida que un compuesto dado debe sintetizarse antes de su uso, dicha síntesis y posterior purificación preferiblemente resultarán en un producto que está sustancialmente libre de cualquier agente potencialmente tóxico que pueda haberse utilizado durante los procedimientos de síntesis o purificación.

Se puede incorporar factores adicionales a las composiciones de la presente invención (es decir, extractos vegetales según se describieron anteriormente en la presente memoria). Estos incluyen, pero no se limitan a, componentes de matriz extracelular (p. ej., vitronectina, laminina, colágeno, elastina), factores de crecimiento (p. ej., FGF 1, FGF 2, IGF 1, IGF 2, PDGF, EGF, KGF, HGF, VEGF, SDF-1, GM-CSF, CSF, G-CSF, TGF alfa, TGF beta, NGF y ECGF), factores de crecimiento [p. ej., eritropoyetina, factor de crecimiento de fibroblastos, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)], hormonas (p. ej., insulina, hormona del crecimiento (GH), CRH, Leptina, Prolactina y TSH), factores angiogénicos (p. ej., angiogenina y angiopoyetina), factores de coagulación y anticoagulación [p. ej., Factor I, Factor XIII, factor tisular, calcio, vWF, proteína C, proteína S, proteína Z, fibronectina, antitrombina, heparina, plasminógeno, heparina de bajo peso molecular (Clixan), quinínogeno de alto peso molecular (HMWK), precalicreína, inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI1), inhibidor del activador de plasminógeno-2 (PAI2), urocinasa, trombomodulina, activador de plasminógeno tisular (tPA), alfa 2-antiplasmina e inhibidor de proteasa relacionado con proteína Z (ZPI)], inhibidores de citocina (p. ej., ciclosporina A; alfa-2macroglobulina, pentamidina, pentoxifilina, dexametasona), inhibidores de quimiocina (p. ej., Péptido 3, NR58.3-14-3), enzimas (p. ej., endoglucosidasas, exoglucosidasas, endonucleasas, exonucleasas, peptidasas, lipasas, oxidasas, descarboxilasas, hidrasas, condroitinasa, condroitinasa ABC, condroitinasa AC, hialuronidasa, queratanasa, heparanasas, variantes de empalme de heparanasas, colagenasa, tripsina, catalasas), neurotransmisores, neuropéptidos (p. ej., sustancia P), vitaminas (p. ej., D-biotina, colina cloruro, ácido fólico, mio-inositol, niacinamida, ácido D-pantoténico, sales de calcio, Piridoxal.HCl, Piridoxina.HCl, Riboflavina, Tiamina.HCl, Vitamina B12, vitamina E, vitamina C, vitamina D, vitamina B1-6, vitamina K, vitamina A y vitamina PP), carbohidratos (p. ej., mono/di/polisacáridos incluidos glucosa, manosa, maltosa y fructosa), iones, quelantes (p. ej., quelantes de Fe, quelantes de Ca), antioxidantes (p. ej., vitamina E, quercetina, secuestrantes de superóxido, superóxido dismutasa, secuestrantes de H₂O₂, antioxidantes, secuestrantes de Fe), ácidos grasos (p. ej., triglicéridos, fosfolípidos, colesterolos, ácidos grasos libres y ácidos grasos no libres, alcohol graso, ácido linoleico, ácido oleico y ácido lipoico), antibióticos (p. ej., penicilinas, cefalosporinas y tetraciclinas), aminoácidos (p. ej., esenciales y no esenciales (de A—Z) especialmente glutamina y arginina), sales (p. ej., sales prurivato y sales de sulfato), sulfatos (p. ej., sulfato de calcio), esteroides (p. ej., andrógenos, estrógenos, progestágenos, glucocorticoides y mineralocorticoides), analgésicos, anestésicos, agentes antibacterianos, agentes antilevadura, agentes antifúngicos, agentes antivíricos, agentes probióticos, agentes antiprotzoarios, agentes antipruríticos, agentes antidermatitis, antieméticos, agentes antiinflamatorios, agentes antihiperqueratóticos, antitranspirantes, agentes antiseborreicos, agentes antihistamina, factores inducibles por hipoxia (p. ej., HIF-1 alfa y beta y HIF-2), catecolaminas (p. ej., epinefrina y norepinefrina), nucleósidos y nucleótidos (p. ej., purinas y Pirimidinas), prostaglandinas (p. ej., prostaglandina E₂), leucotrienos, eritropoyetinas (p. ej., trombopoyetina), proteoglicanos (p. ej., sulfato de heparán, sulfato de queratán), hidroxiapatitas [p. ej., hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂)], haptoglobinas (Hp 1-1, Hp2-2 y Hp1-2), superóxido dismutasas (p. ej., SOD 1/2/3), óxidos nítricos, donantes de óxido nítrico (p. ej., nitroprusido, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU., glutatión peroxidasas, compuestos hidratantes (p. ej., vasopresina), células (p. ej., plaquetas), medio celular (p. ej., M199, DMEM/F12, RPMI, Iscoves), suero (p. ej., suero humano, suero fetal de ternero, suero fetal bovino), tampones (p. ej., HEPES, bicarbonato de sodio), detergentes (p. ej., Tween), desinfectantes, hierbas, extractos de frutas, extractos de legumbres (p. ej., repollo, pepino), extractos de flores, extractos vegetales adicionales, flavinoides (p. ej., jugo de granada), espigas, hojas (p. ej., té verde, manzanilla), polifenoles (p. ej., vino tinto), miel, lectinas, micropartículas, nanopartículas (liposomas), micelas, carbonato de calcio (CaCO₃, p. ej., carbonato de calcio precipitado, carbonato de calcio molido/pulverizado, albacar, PCC, GCC), calcita, piedra caliza, mármol triturado, piedra caliza molida, cal y lime, y creta (p. ej., creta molida, creta de Champagne, creta de Briançon).

60 Según una realización específica, las composiciones de la presente invención no comprenden beta-defensinas.

La presente formulación también puede contener ingredientes, sustancias, elementos y materiales que contienen hidrógeno, grupos alquilo, grupos arilo, grupos halo, grupos hidroxilo, grupos alcoxi, grupos alquilamino, grupos dialquilamino, grupos acilo, grupos carboxilo, grupos carboamido, grupos sulfonamida, grupos aminoacilo, grupos

amida, grupos amina, grupos nitro, compuestos de organo selenio, hidrocarburos e hidrocarburos cíclicos.

La presente formulación también se puede combinar con sustancia tales como peróxido de benzol, vasoconstrictores, vasodilatadores, ácido salicílico, ácido retinoico, ácido azelaico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido piréurico, taninos, benclidenocanfor y derivados de estos, alfa hidroxis, tensioactivos.

5 Las composiciones de algunas realizaciones de la presente invención se pueden conjugar con polietilenglicol (p. ej. PEG, SE-PEG) que conserva la estabilidad (p. ej., contra actividades de proteasa) y/o la solubilidad (p. ej., dentro de un fluido biológico tal como sangre, fluido digestivo) de los ingredientes activos (es decir, las composiciones de extracto vegetal de la presente invención) mientras conserva su actividad biológica y prolonga su semivida.

10 Además de la cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente descrito en la presente memoria, las composiciones de este aspecto de la presente invención también incluyen un vehículo dermatológicamente o cosméticamente aceptable.

15 Las frases «vehículo dermatológicamente aceptable» o «vehículo o diluyente cosméticamente aceptable» hacen referencia a un vehículo que es adecuado para aplicación tópica sobre la piel, es decir, tejidos queratinosos, tiene buenas propiedades estéticas, es compatible con los agentes activos de la presente invención y cualesquiera otros componentes y es seguro y no tóxico para uso en mamíferos.

Se apreciará que el vehículo (p. ej., vehículo cosméticamente aceptable, vehículo farmacéuticamente aceptable) de la presente invención puede comprender ingredientes (p. ej., extractos vegetales) que auxilian en el tratamiento de una afección médica (p. ej., dermatitis atópica).

20 Por lo tanto, el vehículos de algunas realizaciones de la presente invención comprende al menos un extracto vegetal.

Según una realización, el extracto vegetal dentro del vehículo comprende un extracto de raíz de *Rheum Palmatum*, un extracto de fruto de *Cnidium Monnieri* o un extracto de raíz de *Scutellaria baicalensis*.

Según una realización, el vehículo puede comprender, además, glicirrizato dipotásico.

25 Según una realización, el vehículo cosmético comprende un extracto de raíz de *Rheum Palmatum*, un extracto de fruto de *Cnidium Monnieri*, un extracto de raíz de *Scutellaria baicalensis* y glicirrizato dipotásico.

A efectos de mejorar la absorción percutánea de los ingredientes activos (p. ej., extractos vegetales de la presente invención), uno o más de varios agentes se pueden agregar a las composiciones farmacéuticas o cosméticas incluidos, pero sin limitarse a, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida, dimetilformamida, tensioactivos, azona, alcohol, acetona, propilenglicol y polietilenglicol.

30 El vehículo utilizado en las composiciones de la invención puede estar en una amplia variedad de formas. Estas incluyen vehículos de emulsión, incluidos, pero sin limitarse a, emulsiones de aceite en agua, agua en aceite, agua en aceite en agua y aceite en agua en silicona, una crema, un ungüento, una disolución acuosa, una loción, un jabón, una pasta, una emulsión, un gel, un pulverizador o un aerosol.

35 Las emulsiones según la presente invención contienen, en general, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente descrito en la presente memoria y un lípido o aceite. Los lípidos y aceites pueden derivar de animales, plantas o petróleo y pueden ser naturales o sintéticos (es decir, hechos por el hombre). Los ejemplos de emulsificadores adecuados se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 3.755.560, otorgada a Dickert, et al., 28 de agosto de 1973; la patente estadounidense n.º 4.421.769, otorgada a Dixon, et al., 20 de diciembre de 1983; y McCutcheon's Detergents and Emulsifiers, edición norteamericana, páginas 317-324 (1986).

40 La emulsión también puede contener un agente antiespumante para minimizar la formación de espuma tras la aplicación al tejido queratinoso. Los agentes antiespumantes incluyen siliconas de alto peso molecular y otros materiales conocidos en la técnica para dicho uso.

Las emulsiones adecuadas pueden tener un intervalo de viscosidades amplio que dependerá de la forma del producto deseada.

45 Las composiciones de la presente invención se pueden formular en cualquiera de una variedad de formas utilizadas en las industrias farmacéutica y cosmética para aplicación sobre la piel incluidas disoluciones, lociones, pulverizadores, cremas, ungüentos, pomadas, geles, aceites, lavados, champús, acondicionadores, etc., tal como se describirá adicionalmente más adelante.

50 Las composiciones farmacéuticas o cosméticas de la presente invención se pueden formular para que sean suficientemente viscosas para que permanezcan sobre el área de piel tratada, no se evaporen rápidamente o no se retiren fácilmente mediante enjuague con agua, sino que puedan retirarse con la ayuda de jabones, limpiadores o champús.

Los expertos en la técnica conocen los métodos para preparar las composiciones que tienen dichas propiedades y estos se describen detalladamente en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990 (supra); y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 6ª ed., Williams & Wilkins (1995).

5 Las composiciones de la invención objeto que incluyen, pero no se limitan a, lociones y cremas, pueden comprender humectantes o emolientes dermatológica o cosméticamente aceptables. Según se usa en la presente memoria, «emoliente» hace referencia a un material útil para la prevención o alivio de la sequedad, así como también para la protección de la piel. Se conoce y se puede utilizar en la presente una amplia variedad de emolientes adecuados. Véase, p. ej., Sagarin, Cosmetics, Science and Technology, 2ª edición, tomo 1, págs. 3243 (1972), que contiene varios ejemplos de materiales adecuados como emolientes. Un emoliente ejemplar es glicerina. Los emolientes
10 adicionales que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, aceites y ceras de hidrocarburo, tales como aceite mineral, vaselina y similares, aceites y grasas vegetales y animales, tales como aceite de oliva, aceite de palma, aceite de ricino, aceite de maíz, aceite de soja y similares, y lanolina y sus derivados, tales como lanolina, aceite de lanolina, cera de lanolina, alcoholes de lanolina y similares. Otros emolientes incluyen ésteres de ácidos grasos que tienen 10 a 20 átomos de carbono, tales como incluidos mirístico, esteárico, isoesteárico, palmítico y similares, tales como miristato de metilo, miristato de propilo, miristato de butilo, estearato de propilo, isoestearato de propilo, palmitato de propilo y similares. Otros emolientes incluyen ácidos grasos que tienen 10 a 20 átomos de carbono, incluidos esteárico, mirístico, láurico, isoesteárico, palmítico y similares. Los emolientes también incluyen alcoholes grasos que tienen diez a veinte átomos de carbono, tales como cetilo, miristilo, laurilo, isoestearilo, estearilo y similares.

20 La composición de la presente invención también puede incluir componentes adicionales que se agregan, por ejemplo, a efectos de enriquecer las composiciones con fragancias y factores de nutrición de la piel.

Dichos componentes se seleccionan de forma adecuada para uso sobre tejido queratinoso humano sin inducir toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica y similares dentro del alcance de la opinión médica bien fundada. Además, dichos componentes opcionales son útiles siempre que no alteren de forma inaceptable los
25 beneficios de los compuestos activos de la invención.

El CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, segunda edición (1992) describe una amplia variedad de ingredientes cosméticos no limitantes utilizados habitualmente en la industria del cuidado de la piel que son adecuados para uso en las composiciones de la presente invención. Los ejemplos de estas clases de ingredientes incluyen: abrasivos, absorbentes, componentes estéticos tales como fragancias, pigmentos, materiales de color/colorantes, aceites
30 esenciales, refrescantes de la piel, astringentes, etc. (p. ej., aceite de clavo, mentol, alcanfor, aceite de eucalipto, eugenol, lactato de metilo, destilado de hamamelis), agentes antiacné, agentes antiaglomerantes, agentes antiespumantes, agentes antimicrobianos (p. ej., butilcarbamato de yodopropilo), antioxidantes, aglutinantes, aditivos biológicos, agentes tampón, agentes de carga, agentes quelantes, aditivos químicos, colorantes, astringentes cosméticos, biocidas cosméticos, desnaturalizantes, astringentes de fármacos, analgésicos externos, formadores o materiales de película, p. ej., polímeros, para auxiliar en las propiedades formadoras de película y la substantividad de la composición (p. ej., copolímero de eicoseno y vinil pirrolidona), agentes opacificantes, ajustadores de pH, propulsores, agentes reductores, secuestrantes, agentes acondicionadores de la piel (p. ej., humectantes, incluidos diversos y oclusivos), agentes calmantes y/o curativos de la piel (p. ej., pantenol y derivados (p. ej., etil pantenol), aloe vera, ácido pantoténico y sus derivados, alantoína, bisabolol y glicirricinato dipotásico), agentes de tratamiento
40 de la piel, espesantes y vitaminas y derivados de estos.

Según se mencionó anteriormente, las composiciones de la presente invención se pueden aplicar directamente sobre la piel. Alternativamente, se pueden administrar a través de aplicación cutánea normal mediante diversos sistemas de suministro de fármacos transdérmicos que se conocen en la técnica, tales como parches transdérmicos que liberan la composición en la piel de forma temporizada. Otros sistemas de suministro de fármacos conocidos en
45 la técnica incluyen una botella de aerosol presurizada, iontoforesis o sonoforesis. La iontoforesis se emplea para aumentar la permeabilidad de la piel y facilitar el suministro transdérmico. Las patentes estadounidenses números 5.667.487 y 5.658.247 describen un aparato ionosónico adecuado para el transporte ultrasónico-iontoforético de agentes terapéuticos a través de la piel. Alternativa o adicionalmente, se pueden emplear liposomas o micelas como un portador de suministro.

50 Se apreciará que las composiciones de la presente invención se pueden utilizar en combinación con otras terapias que se aplican actualmente tales como, pero sin limitarse a, fototerapia o terapia con luz [por ejemplo, la terapia con luz para la dermatitis inflamatoria] y terapia con antibiótico (p. ej., local o sistémica).

Según se usa en la presente memoria, el término «alrededor de» se refiere a $\pm 10\%$.

55 Los términos y expresiones «comprende», «que comprende», «incluye», «que incluye», «que tiene» y sus conjugaciones significan «que incluye, pero no se limita a».

La expresión «que consiste en» significa «que incluye y se limita a».

La expresión «que consiste esencialmente en» significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, etapas o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, etapas o partes adicionales no alteran de

forma considerable las características básicas y nueva de la composición, método o estructura reivindicada.

Según se usa en la presente, las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Por ejemplo, el término «un compuesto» o «al menos un compuesto» puede incluir una pluralidad de compuestos, incluidas mezclas de estos.

- 5 A lo largo de la presente solicitud, diversas realizaciones de la presente invención se pueden presentar en formato de intervalo. Se entenderá que la descripción en formato de intervalo se hace meramente por ser conveniente y breve, y no se deberá interpretar como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un intervalo describe de forma específica todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro del intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 debe considerarse que describe específicamente los subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como los números individuales dentro de dicho intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto tiene aplicación independientemente de la amplitud del intervalo.

- 15 Cada vez que se indica un intervalo numérico en la presente memoria, pretende incluir cualquier número mencionado (en fracción o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases «en el intervalo entre» un primer número indicado y un segundo número indicado y «en el intervalo de» un primer número indicado «hasta» un segundo número indicado se utilizan de forma intercambiable en la presente memoria y pretenden incluir el primer y segundo números indicados y todos los números en fracción y enteros entre estos.

- 20 Según se usa en la presente memoria, el término «método» hace referencia a modos, medios, técnicas y procedimientos para lograr una tarea dada que incluyen, pero no se limitan a, los modos, medios, técnicas y procedimientos que se conocen o que se desarrollan fácilmente a partir de modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos para los profesionales de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica o médica.

Varias realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se estableció anteriormente y tal como se reivindica en la sección de reivindicaciones más adelante tienen soporte experimental en los siguientes ejemplos.

25 Ejemplos

A continuación, se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con la descripción que antecede ilustran la invención de una manera no restrictiva.

- 30 En general, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se describen exhaustivamente en la literatura. Véase, por ejemplo, «Molecular Cloning: A laboratory Manual», Sambrook et al., (1989); «Current Protocols in Molecular Biology», tomos I-III, Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., «Current Protocols in Molecular Biology», John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, «A Practical Guide to Molecular Cloning», John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., «Recombinant DNA», Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) «Genome Analysis: A Laboratory Manual Series», tomos 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías según se establecen en las patentes estadounidenses números 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; «Cell Biology: A Laboratory Handbook», tomos I-III Cellis, J. E., ed. (1994); «Current Protocols in Immunology», tomos I-III, Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), «Basic and Clinical Immunology» (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), «Selected Methods in Cellular Immunology», W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoanálisis disponibles se describen exhaustivamente en la literatura de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; «Oligonucleotide Synthesis» Gait, M. J., ed. (1984); «Nucleic Acid Hybridization» Hames, B. D. and Higgins S. J., eds. (1985); «Transcription and Translation» Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984); «Animal Cell Culture» Freshney, R. I., ed. (1986); «Immobilized Cells and Enzymes» IRL Press, (1986); «A Practical Guide to Molecular Cloning» Perbal, B., (1984) y «Methods in Enzymology», tomos 1-317, Academic Press; «PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications», Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., «Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual», CSHL Press (1996). A lo largo del presente documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos en estas se conocen en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

Ejemplo 1

Desarrollo de un modelo in-vitro para la evaluación de la inhibición de IL-13

Materiales y procedimientos experimentales

Cultivo de células KU812

- 55 Se sembraron células KU812 (basófilos humanos, ATCC CRL-2099TM) en matraces de cultivo utilizando RPMI

complementado con suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) al 10 %, y 50 µg/ml de gentamicina y 50 µg/ml de amfotericina B o pen/estrep. Las células sembradas se incubaron a 37 ± 2 °C a 5 ± 1 % de CO₂ y los medios de cultivo se cambiaron 2-3 veces por semana hasta que se obtuvo una cantidad suficiente de células.

Proceso de extracción (del material de prueba)

- 5 Las hierbas se seleccionaron según una inspección de calidad (diferenciación y autenticación de materiales sin procesar, análisis de metales pesados, verificación de residuos de pesticidas y análisis de contenido de ingrediente activo).

El material herbario cortado se homogeneizó con x10 volúmenes de agua y se extrajo durante 2 horas a 80 °C con agitación. La extracción se repitió tres veces utilizando el mismo procedimiento y se mezclaron las tres extracciones.

- 10 El homogenado se recogió, se filtró a través de un tamiz de malla 400, se concentró (80 °C, 0,1 MPa) y después se centrifugó a 10000 r/ min durante 20 min.

Los extractos se purificaron mediante resina macroporosa y luego se concentraron hasta un volumen necesario. La inspección de calidad de los extractos se llevó a cabo según la norma de calidad (carácter natural, densidad relativa, valor de pH, análisis de metales pesados, ensayo microbiológico y determinación del contenido de ingrediente activo).

- 15

Ensayo MTS de citotoxicidad del material de prueba previo a la selección

Para su uso en el ensayo, las células se sembraron en una placa de 96 pocillos (aproximadamente $0,1$ a $0,2 \times 10^6$ células por pocillo) en 100 µl de medios de cultivo celular sin rojo de fenol. A continuación, se agregó el material de prueba (1000 µl) preparado en los medios de cultivo celular a su concentración final de 2x a cada pocillo para alcanzar un volumen final del cultivo de 200 µl. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 ± 2 °C y 5 ± 1 % de CO₂. Después de la incubación, se agregaron 20 µl de una disolución 20:1 de MTS:PMS (Promega) a cada pocillo y las placas se volvieron a colocar en la incubadora durante un período adicional de 4 horas. A continuación, se leyeron las placas a 490 nm usando un lector de placas.

- 20

Ensayo de liberación de IL-13

- 25 Antes de su uso en el ensayo de liberación de IL-13, se cultivaron células KU812 durante dos días en medios RPMI sin FBS. Después de esta incubación de dos días, se utilizó RPMI con FBS para el ensayo de IL-13.

Las células KU812 se sembraron en una placa de 96 pocillos (aproximadamente $0,2$ a $0,3 \times 10^6$ células por pocillo) en 100 µl de RPMI. A continuación, se agregó el material de prueba (100 µl) preparado en los medios de cultivo celular a su concentración final de 2x a cada pocillo y las células se incubaron durante aproximadamente 6 horas a 37 ± 2 °C y 5 ± 1 % de CO₂. Después de este período de tratamiento, se agregaron 10 µl de una disolución concentrada que contenía PMA y ionomicina a cada pocillo (concentración final en el cultivo: 20 ng/ml de PMA y 1 µM) y las placas se incubaron durante toda la noche a 37 ± 2 °C y 5 ± 1 % de CO₂. A continuación, se sometió a ensayo el sobrenadante del cultivo celular para determinar la presencia de IL-13.

- 30

ELISA de IL-13 (RayBiotech)

- 35 Se preparó una serie de estándares (0 - 40 pg/ml) y se dispensaron 100 µl de cada uno de estos estándares en dos pocillos (duplicado) en la placa de 96 pocillos. A continuación, se agregaron 25 µl de cada muestra de sobrenadante de cultivo celular y 100 µl de Diluyente B a pocillos adicionales (las muestras se diluyeron con Diluyente B para que los niveles de IL-13 estuvieran dentro del intervalo de la curva estándar) y las placas se incubaron durante dos horas y media a temperatura ambiente. Después de la incubación, se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado.
- 40 Después de retirar el último lavado, se agregaron 100 µl de un anticuerpo de detección conjugado con biotina. Después de incubar las placas durante una hora a temperatura ambiente, las placas se volvieron a lavar según se describió anteriormente. A continuación, se agregó HRP-estreptavidina (100 µl) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente. Después de retirar el último lavado, se agregaron 100 µl de disolución de sustrato (peróxido de hidrógeno + tetrametilbencidina como cromagen) a cada pocillo. Luego de que se produjo un desarrollo de nivel de color suficiente, se agregaron 50 µl de solución de detenimiento (ácido sulfúrico 2N) a cada pocillo y las placas se leyeron a 460 nm.
- 45

Cálculos

Ensayo de viabilidad celular (ensayo MTS)

- 50 Se determinó la absorbancia media de los pocillos no tratados con el material de prueba y se utilizó como representación del 100 % de viabilidad (no tratadas). Este valor después se utilizó para determinar la viabilidad de los pocillos tratados con los materiales de prueba (tratadas) utilizando la siguiente ecuación: ((tratadas) / (no tratadas)) x 100.

Análisis ELISA de IL-13

Para el ensayo ELISA de IL-13, se utilizaron los valores de absorbancia para los estándares conocidos para generar una curva estándar. A continuación, se determinaron los valores para las muestras desconocidas a partir de esta curva estándar.

5 Resultados

Desarrollo del ensayo basado en células

10 Los presentes inventores utilizaron un modelo de cultivo de basófilos humanos KU812 para evaluar la capacidad de los extractos herbarios para ejercer un efecto sobre la liberación de IL-13. En el sistema de ensayo utilizado en la presente memoria, las células KU812 se pretrataron con los materiales de prueba durante aproximadamente 6 horas, y luego con los materiales de prueba todavía presentes, las células se estimularon con acetato de forbol miristato (PMA) y ionóforo de calcio ionomicina. Después de la adición de PMA y ionomicina, las células se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, se sometió a ensayo el sobrenadante del cultivo celular para determinar la liberación de IL-13.

Células inmunitarias como modelo: basófilos KU812

15 Las citocinas IL-4 y IL-13 se producen a partir de muchos tipos de células tales como linfocitos T, mastocitos y basófilos. Aunque se describió hace mucho tiempo que IL-4 deriva exclusivamente de linfocitos T CD4+, estudios recientes *in vitro* demostraron de forma clara que los basófilos humanos son responsables de la mayoría de las IL-4 e IL-13 generadas en los leucocitos de sangre periférica [Higa S. et al., *J Allergy Clin Immunol* (2003) 111 (6): 1299-1306]. Existe también evidencia creciente de la función de los basófilos en la patogénesis de enfermedades atópicas tales como asma bronquial, dermatitis atópica y rinitis atópica.

25 Los basófilos son una población pequeña de leucocitos de sangre periférica que contienen gránulos citoplasmáticos que se tiñen con tintes basófilos. Los basófilos y mastocitos comparten muchas propiedades bioquímicas y funcionales, p. ej., la expresión del receptor de afinidad elevada para IgE, y la capacidad de liberar histamina y otros mediadores tras la activación. Los basófilos maduros típicamente se encuentran en la circulación, aunque se pueden encontrar en tejidos inflamados. Por otro lado, los mastocitos se encuentran exclusivamente en el tejido.

La reticulación de mastocitos y basófilos con antígenos específicos conduce a la liberación de mediadores inflamatorios y citocinas tales como IL-4, IL-13 e IL-5 que son moléculas clave relacionadas con la producción de IgE, diferenciación de TH2 e inflamación alérgica.

30 En función de esta información, los presentes inventores decidieron trabajar con células KU812, una línea celular de basófilos humanos establecida a partir de un paciente con leucemia basófila en crisis blástica.

Diferenciación de KU812

Las células KU812 son células precursoras de basófilos inmaduras y también sirven como modelo de diferenciación basófila. La diferenciación de las células KU812 induce varios cambios, incluido el aumento del contenido total de histamina, la granulación aumentada y la expresión de receptores de afinidad elevada para IgE.

35 Se ha demostrado que diferentes factores sirven para diferenciar la línea celular KU812 en basófilos [Nilsson G. et al., *Immunology* (1994) 81: 73-78; Fukuda T. et al., *Blood* (1987) 70: 612]. Varias citocinas pueden inducir su diferenciación en basófilos, incluidas TNF- α , IL-6, IL-3 y IL-4. La diferenciación se observó cuando las células KU812 se cultivaron con una combinación de butirato de sodio y medios acondicionados de la línea celular de linfocitos T humanos Mo.3. Además, los medios acondicionados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) cultivadas de individuos atópicos induce la diferenciación de células KU812. El o los factores en el sobrenadante de los medios acondicionados responsables por este efecto todavía no se han caracterizado. También se ha demostrado que las células KU812 pueden sufrir diferenciación en ausencia de factores exógenos, en condiciones libres de suero.

45 Los presentes inventores utilizaron basófilos humanos KU812 como un tipo de célula modelo para hallar hierbas que inhiben la expresión de IL-13. En su esfuerzo por calibrar un sistema adecuado para el análisis, los presente inventores hallaron que después de dos días en condiciones libres de suero, las células KU812 expresaban niveles más altos de IL-13, probablemente debido a la diferenciación de las células. Por consiguiente, los presentes inventores decidieron utilizaron condiciones libres de suero antes de agregar los estimulantes y los extractos de hierbas.

50 Citocinas

Las defensinas (hBD) se producen a partir de queratinocitos de la piel humana tras una lesión o inflamación y se reducen por medio citocinas producidas por mastocitos, basófilos y linfocitos cooperadores tipo 2. Se ha establecido que las lesiones de DA se asocian a la expresión aumentada de IL-4 y IL-13 [Albanesi C. et al., *J. Immunol.* (2007) 179(2): 984 — 992]. La citocinas suprimen la expresión del ARNm de hBD-2 y hBD-3 [Albanesi C. et al., *supra*]. Por

lo tanto, IL-4 y IL-13 pueden ser responsables de la expresión baja de defensina en estas lesiones. A efectos de profundizar el conocimiento sobre la expresión de las defensinas, los presentes inventores evaluaron los efectos inhibidores de los extractos de hierbas sobre los niveles de expresión de IL-4 y IL-13 en basófilos humanos KU812.

5 Dado que las funciones de IL-13 se superponen de forma considerable con las de IL-4, los componentes que inhiben la expresión de IL-13 normalmente también inhiben la expresión de IL-4. Por lo tanto, los presentes inventores decidieron evaluar el efecto inhibidor de los extractos de hierbas sobre la expresión de IL-4 utilizando células KU812. Los inventores midieron una expresión muy escasa de IL-4 tras la estimulación con PMA y ionomicina (no se muestran los datos). Tras consultar la literatura, se constató que algunas señales empleadas por factores de imprimación tales como IL-3 favorecen la producción de IL-13 en lugar de IL-4 [Higa et al., J Allergy Clin Immunol (2003) 111(6): 1299-1306]. Por lo tanto, los presentes inventores continuaron midiendo solo la expresión de IL-13.

Testigos positivos

15 Los presentes inventores eligieron utilizados dos sustratos como testigos positivos: Fisetina y Dexametasona. En el pasado se demostró que la fisetina suprime la inducción de la expresión de ARNm de IL-4, IL-13 y IL-5 mediante células KU812 estimuladas por A23187 [Higa et al (2003), supra]. En los presentes resultados, la inhibición de fisetina fue significativa, sin embargo, el porcentaje de inhibición fue relativamente bajo. Por lo tanto, los inventores agregaron dexametasona como testigo positivo que exhibía porcentajes de inhibición altos y significativos. En el pasado, se demostró que la dexametasona reduce la inflamación y deprime el sistema inmunitario posiblemente mediante la inhibición de la producción de IL-4 y IL-13 por parte de linfocitos T y también basófilos [Shimizu et al., Clin Exp Allergy (1998) 28(4): 497-503].

20 Ejemplo 2

Selección de extractos herbarios para actividad de estimulación de beta-defensina utilizando células epidérmicas (Queratinocitos: células HaCaT)

Materiales y procedimientos experimentales

Línea celular de queratinocitos (HaCaT)

25 Se utilizó una línea celular de queratinocitos. Las células HaCaT se sembraron en matraces de cultivo 75 T utilizando DMEM (GIBCO) complementado con FBS al 10 % (GIBCO) y antibióticos (GIBCO). Las células se incubaron a 5 % de CO₂ y 37 °C, con cambio de medios de cultivos al alcanzar 90 % de confluencia (relación de % de superficie de crecimiento con respecto a superficie de placa). Para seleccionar los extractos, se agregó extracto (0,3 ml) al sobrenadante de las células HaCaT cultivadas (~ 90 a 95 % de confluencia) y las células se incubaron durante 48 h.

Análisis de PCR en tiempo real de la expresión de beta-defensina 3

Aislamiento de ARN total

35 Se aisló el ARN total con TRIZOL (Invitrogen Life Technologies) según las recomendaciones del fabricante. El ARN se precipitó con etanol y se volvió a suspender en pirocarbonato dietílico H₂O. El ARN de las células HaCaT se volvió a purificar una vez para obtener el ARN de pureza adecuada. La concentración de ARN se determinó mediante un espectrofotómetro y el ARN total obtenido se convirtió en ADNc total solo después de confirmar la integridad del ARN mediante electroforesis sobre un gel de agarosa.

Análisis de PCR en tiempo real

40 El ADNc se sintetizó a partir de 200 ng de ARN purificado utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. La expresión de betadefensina 3 humana junto con la expresión de GAPDH se analizó utilizando AB Taqman MasterMix (Applied Biosystems, n.º de pieza: 4369016, EE. UU.). Los cebadores para beta-defensina 3y GAPDH fueron cebadores en el inventario para ensayos de expresión génica de Taqman.

45 La amplificación se llevó a cabo en 40 ciclos (95 °C, 30 segundos) y posteriormente ciclos adicionales (58 °C, 30 segundos) en ABI Real-time PCR 7500 (Applied Biosystems). Los datos se analizaron mediante el programa informático del sistema de PCR en tiempo real. Se calculó la expresión relativa de cada extracto y ajustó para la PCR en tiempo real de la expresión GAPDH (normalización por GAPDH). Los estándares de expresión obtenidos para ADNc diluido 100 veces, 10 veces y 1 vez se confirmaron en cada experimento de PCR en tiempo real (véase la Figura 1). La prueba testigo con células HaCaT no tratadas demostró que esta PCR en tiempo real es muy sensible y confiable utilizando células HaCaT (véase la Figura 2).

50 Proceso de extracción

Las hierbas se seleccionaron según una inspección de calidad (diferenciación y autenticación de materiales sin procesar, análisis de metales pesados, verificación de residuos de pesticidas y análisis de contenido de ingrediente activo).

El material herbario cortado se homogeneizó con x10 volúmenes de agua y se extrajo durante 2 horas a 80 °C con agitación. La extracción se repitió tres veces utilizando el mismo procedimiento y se mezclaron las tres extracciones. El homogenado se recogió, se filtró a través de un tamiz de malla 400, se concentró (80 °C, 0,1 MPa) y después se centrifugó a 10000 r/ min durante 20 min.

- 5 Los extractos se purificaron mediante resina macroporosa y luego se concentraron hasta un volumen necesario. La inspección de calidad de los extractos se llevó a cabo según la norma de calidad (carácter natural, densidad relativa, valor de pH, análisis de metales pesados, ensayo microbiológico y determinación del contenido de ingrediente activo).

Resultados

- 10 La presente invención examinó la estimulación de las beta-defensinas humanas, esto se basó en los informes científicos anteriores que demostraron que las beta-defensinas humanas, especialmente las isoformas 2 y 3, sirven como barreras antimicrobianas importantes en la piel humana. La expresión reducida de beta-defensinas humanas en la piel de pacientes con dermatitis atópica provoca la colonización anormal de microorganismos relacionados con la dermatitis atópica tales como *Staphylococcus aureus*. Aunque la expresión reducida de ambas isoformas se relaciona con la dermatitis atópica, varios informes científicos recientes han demostrado que la isoforma 3 de la beta-defensina humana tiene una función central en la patología de la dermatitis atópica. La isoforma 3 de la beta-defensina humana muestra un espectro de actividad antimicrobiana amplio y tiene actividad intensa a concentraciones fisiológicas contra *S. aureus* por sí sola [Harder et al., Nature (1997) 387: 861; Harder et al., J Biol Chem (2001) 276: 5707-13], mientras que hBD-2 requiere la presencia de LL-37 para destruir a *S. aureus* [Xuejun Chenba et al., J. Dermatol. Science (2005) 40(2), 123-132].

Ejemplo 3

Selección de extractos herbarios para la inhibición de IL-13 utilizando basófilos KU812

Materiales y procedimientos experimentales

Véase el Ejemplo 1, más atrás en la presente memoria.

- 25 Resultados

Resultados de MTS

- 30 Se utilizaron diferentes extractos herbarios (véase la Tabla 1 a continuación) para establecer un intervalo de concentraciones seguras para los materiales de prueba para uso en el ensayo de inhibición de IL-13. Los resultados de los ensayos MTS que se llevaron a cabo se presentan en las Figuras 3A-D. Los valores representan los porcentajes de viabilidad con respecto al testigo (no tratadas). Estos resultados se utilizaron para establecer un intervalo de concentraciones seguras para los materiales de prueba utilizados en el ensayo de inhibición de IL-13. La identificación del material de prueba se representa en la Tabla 1.

Tabla 1: Identificación y análisis del material de prueba

Identificación de material de prueba	Nombre de la hierba	valor de pH	Residuo después de la evaporación (%)	Recuento microbiano total
1	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Regaliz)	4,08	13,7	0
2	<i>Saposhnikovia divaricata</i>	3,29	24,4	0
3	<i>Radix Tripterygii wilfordii</i>	3,51	4,4	0
4	<i>Cimicifuga racemosa</i>	3,59	8	0
5	<i>Celosia argentea</i>	4,79	2,4	0
6	Raíz de Coptis	3,27	13,3	0
7	<i>Radix Salviae miltiorrhizae</i>	3,31	31,2	0
8	<i>Saururus Chinensis</i> (Hojas)	2,42	17,2	0
9	<i>Calendula officinalis</i>	2,97	14,1	0
10	<i>Gentian</i>	2,36	9	0

ES 2 645 245 T3

11	<i>Mentha aquatica L</i>	3,33	7,9	0
12	Raíz de <i>Dandelion/ Taraxacum officinals</i>	3,31	12,1	0
13	Fruto de ciprés de verano	4,02	7,6	0
14	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	2,57	21,6	0
15	<i>Stellaria dichotoma L. var. lanceolata. Raíz</i>	3,63	25,5	0
16	<i>Fritillaria verticillata</i>	3,68	6,1	0
17	<i>Silybum marianum</i>	3,25	5,6	0
18	<i>Actinidia polygama</i>	4,02	16,7	0
19	<i>Phellodendron- Extracto con agua</i>	5,06	16,34	0
20	<i>Sapindus mukurossi- Extracto con agua</i>	5,16	24,9	0
21	<i>Radix Sophora flarescents- Extracto con agua</i>	4,15	22,35	0
22	<i>Sanguisorba officinalis (DiYu)- Extracto con agua</i>	4,02	21,28	0
23	<i>Fructus Cnidium</i>	3,86	10,76	0
24	<i>Camelia japonica</i>	2,94	25,3	0
25	<i>Scutellaria baicalensis- Extracto con agua</i>	3,54	23,24	0
26	<i>Rheum palmatum- Extracto con agua</i>	4,68	21,23	0
27	<i>Chrysanthemum - Extracto con agua</i>	3,96	22,49	0
28	<i>Portulaca- Extracto con agua</i>	4,87	26,75	0
A	Corteza de peonía	2,78	17,9	0
B	<i>Angelica sinensis</i>	3,06	29,1	0
C	Raíz de <i>Astragalus membranaceus</i>	3,06	22,2	0
D	Fruto de <i>Evodia rutaecarpa</i>	3,14	12,4	0
E	<i>Polygonum cuspidatum</i>	2,94	12,8	0
F	<i>Liriope platyphylla</i>	2,9	23,6	0
G	<i>Smilax glabra rhizoma</i>	2,71	6,9	0
H	<i>Curcuma longa</i>	4,17	5,9	0
I	Indigo naturalis	9,23	0,1	
J	<i>Semen Hydnocarpus hainanensi</i>	4,14	2,7	0

Resultados de inhibición de IL-13

Las concentraciones del material de prueba evaluados se determinaron según los resultados de MTS (presentados anteriormente). Los resultados de los ensayos de inhibición de IL-13 que se llevaron a cabo se presentan en las Figuras 4A-G y se resumen en la Tabla 2, más adelante, y muestran que diversos extractos herbarios reducen significativamente la cantidad de IL-13 liberada, incluidos, por ejemplo, *Glycyrrhiza glabra*, *Cimicifuga racemosa* y *Silybum marianum*. La dexametasona se utilizó como testigo positivo a una concentración de 10 µM.

5

Resumen

5 Los presentes inventores evaluaron el efecto inhibitor de los diferentes extractos herbarios sobre la expresión de IL-4 utilizando células KU812. El propósito de este estudio fue determinar si los materiales de prueba podían inhibir la liberación de IL-13 a partir de células KU812 estimuladas con PMA e ionomicina. Se observó que diversos extractos herbarios reducen significativamente la cantidad de IL-13 liberada, incluidos, por ejemplo, *Glycyrrhiza glabra*, *Cimicifuga racemosa* y *Silybum marianum*. Los porcentajes de inhibición de IL-13 mediante los extractos herbarios se presentan en la Tabla 2 a continuación-

Tabla 2: Porcentajes de inhibición de IL-13 mediante extractos herbarios en células KU812

Nombre de la hierba	n.º	1 %	0,01 %	0,001 %
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	1	97,67 %	43,22 %	
<i>Tripterygii wilfordii</i>	3	93,9 %	53,34 %	33,2 %
<i>Cimicifuga racemosa</i>	4	96,76 %	16,09 %	0,3 %
<i>Salviae miltiorrhizae</i>	7	76,58 %		
<i>Silybum marianum</i>	17	98,65 %	10,8 %	1,2 %
<i>Sanguisorba officinalis</i>	22	97,5 %	31,9 %	
<i>Camelia japonica</i>	24	84,2 %	8,85 %	-
<i>Scutellaria baicalensis</i>	25	79 %	-	-
<i>Rheum palmatum</i>	26	62,26 %	-	-
<i>Peonia suffruticosa</i>	A	76,98 %	-	-
<i>Angelica sinensis</i> *	B	18,74 %	-	-
<i>Polygonum cuspidatum</i>	E	18,74 (concentración 0,5 %)	-	-
Fisteína **		35,69 %	17,3 %	26,52 %
Dexametasona	10 µM	52 %		

* Reducciones ligeras (no significativas)

10 ** La fisetina se midió a concentraciones de 100 µM, 10 µM y 1 µM.

Ejemplo 4

Selección de extractos herbarios para estimulación de beta-defensina 3 humana

Materiales y procedimientos experimentales

Véase el Ejemplo 2, más atrás en la presente memoria.

15 Resultados

Se evaluaron 400 extractos herbarios en el presente estudio. De estos, solo seis extractos herbarios exhibieron un efecto estimulante destacable sobre la beta-defensina-3 humana (hBD-3), cuando se considera su efecto directo antes o después de la normalización por GAPDH. Por lo tanto, aunque casi todos los extractos herbarios evaluados mostraron un efecto no significativo sobre la expresión de hBD-3, seis extractos herbarios exhibieron efectos estimulantes cuando se midieron a una concentración de 0,33 %, como se muestra en las Figuras 5-9.

25 Los extractos herbarios números 136 y 137 exhibieron porcentajes de estimulación de 573 ± 48 % y 693 ± 182 %, respectivamente, como se muestra en la Figura 5. De forma interesante, el número 136 es *Rubi fructus*, que se cultiva en China y el número 137 es *Rubi fructus* que se cultiva en Corea. Los extractos herbarios que exhibieron efecto de estimulación de hBD-3 son: *Lysimachiae foenumgraeci herba*, *Ailanthi radices cortex*, *Galla rhois*, *Peucedani radix* y *Albizziae cortex* (los números 171, 194, 232, 246 y 362, respectivamente). El efecto estimulante resumido y los valores estadísticos de estos seis extractos herbarios sobre hBD-3 se indican en la Tabla 3, más

adelante, y en la Figura 10 (los seis extractos herbarios identificados se evaluaron tres veces y se calcularon los valores medios estadísticos).

Tabla 3: Efecto estimulante resumido de seis extractos herbarios sobre la expresión de hBD-3

n.º	Nombre de la hierba	1ª prueba (%)	2ª prueba (%)	3ª prueba (%)	Media ± DT	Viabilidad
136(*)	<i>Rubi fructus</i>	524	575	619	573 ± 48	baja
137(*)	<i>Rubi fructus</i>	900	559	619	693 ± 182	
171	<i>Lysimachiae foenumgraeci herba</i>	831	702	1082	872 ± 193	
194	<i>Ailanthi radice cortex</i>	868	1042	1420	1110 ± 282	baja
232	<i>Galla rhois</i>	1744	1203	1502	1483 ± 271	baja
246	<i>Peucedani radix</i>	2912	1859	1903	2225 ± 596	baja
362	<i>Albizziae cortex</i>	853	933	792	859 ± 71	

(*) Los números 136 y 137 son las mismas plantas cultivadas en China y Corea, respectivamente.

5 Ejemplo 5

Optimización de los procesos de extracción de los extractos herbarios identificados

Materiales y procedimientos experimentales

Extracción de los ingredientes activos de los extractos herbarios

10 Para evaluar los efectos de los disolventes utilizados comúnmente para la extracción, los presentes inventores extrajeron las fuentes herbarias indicadas en agua caliente, en 50 % de EtOH o 50 % de MtOH.

Resultados

Comparación de diferentes disolventes de extracción para la estimulación de hBD-3

15 Para identificar modos más eficaces para extraer los ingredientes activos de los extractos herbarios identificados, los presentes inventores compararon la estimulación de hBD-3 mediante las hierbas seleccionadas utilizando tres disolventes de extracción diferentes: 50 % de EtOH, 50 % de MtOH y 100 % de agua destilada. La estimulación se calculó mediante normalización de los valores de los grupos testigo para cada disolvente. Como se muestra en la Figura 11, la estimulación de beta-defensina 3 humana mediante los extractos herbarios números 136, 137, 171, 194, 232, 246 y 362 fue más alta cuando se utilizaron extractos en agua caliente. Otros disolventes (50 % de EtOH y 20 MtOH) exhibieron actividades relativamente altas, pero más bajas (65 % con respecto a 95 %) que con la extracción con agua.

Ejemplo 6

Selección de extractos herbarios que tiene actividad estimulante sobre la expresión de beta-defensina por su actividad como inhibidores de IL-13, utilizando basófilos KU812

Materiales y procedimientos experimentales

25 Véase el Ejemplo 1, más atrás en la presente memoria.

Resultados

Después de los estudios *in-vitro* primarios, los presentes inventores hallaron 10 extractos herbarios que inhibían la expresión de IL-13 (según se midió mediante ELISA) y 6 extractos herbarios que estimulaban la expresión de beta-defensina 3 (según se midió mediante RT-PCR).

30 A continuación, los presentes inventores eligieron los extractos herbarios que exhibieron las actividades más significativas en ambas categorías. Los extractos herbarios que pueden exhibir toxicidad (tales como *Radix Tripterygii Wilfordii*) o los extractos herbarios que no se conocen para aplicación humana y no tienen nombres en la

INCI (Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos) (tales como *Terminariae Fructus*) se eliminaron, aunque exhibieran actividades significativas.

5 Para elegir la mezcla herbaria final, los presente inventores evaluaron la actividad de los extractos herbarios que exhibían inhibición de IL-13 para determinar su capacidad para estimular la beta-defensina y los extractos herbarios que exhibían estimulación de defensina para determinar su capacidad para inhibir la liberación de IL-13. Los inventores también midieron el efecto sinérgico entre los extractos herbarios en ambos ensayos (ELISA y RT-PCR). Se eligieron siete extractos herbarios (según se describen en la Tabla 4, a continuación).

Tabla 4: Extractos herbarios

Extractos herbarios que exhibieron inhibición de IL-13	Extractos herbarios que exhibieron estimulación de beta-defensina
Extracto de raíz de <i>Glycyrrhiza glabra</i> (Regaliz)	Extracto de <i>Ailanthus altissima</i>
<i>Cimicifuga racemosa</i> (Hierba sonajero)	Extracto de <i>Galla rhois gallnut</i> (Galla chinensis)
<i>Silybum marianum</i>	<i>Peucedanum praeruptorum</i> (Peucedanti Radix)
<i>Sanguisorbae officinalis</i> (Radix S anguisorbee)	

10 Resultados de MTS

Los extractos herbarios que exhibieron actividad de estimulación de beta-defensina en el estudio *in-vitro* primario (véase el Ejemplo 4 y la Tabla 4, anterior) se midieron para determinar la viabilidad celular en un ensayo MTS, para evaluar la concentración segura para los materiales de prueba para uso en el ensayo de inhibición de IL-13. Los resultados del ensayo MTS que se llevó a cabo se presentan en la Figura 12. Los valores representan los porcentajes de viabilidad con respecto al testigo (no tratadas).

Resultados de inhibición de IL-13

20 Los extractos herbarios que exhibieron actividad de estimulación de beta-defensina en el estudio *in-vitro* primario (véase el Ejemplo 4 y la Tabla 4, anterior) se midieron para determinar su capacidad para inhibir la liberación de IL-13. Los resultados del ensayo de inhibición de IL-13 que se llevó a cabo se presentan en la Figura 13 y muestran que *Ailanthus altissima* y *Galla rhois gallnut* exhiben actividad inhibidora de IL-13. La concentración de los materiales de prueba evaluados se correlacionó con los resultados de MTS (0,3 %). La dexametasona se utilizó como testigo positivo a una concentración de 10 μ M.

Resumen

25 El propósito de este estudio fue determinar si los materiales de prueba que se halló que estimulaban la expresión de beta-defensina en queratinocitos podían inhibir también la liberación de IL-13 a partir de células KU812 estimuladas con PMA e ionomicina. Los extractos herbarios de *Ailanthus altissima* y *Galla rhois gallnut* exhibieron actividad de inhibición de IL-13 significativa.

Entre los extractos herbarios que exhibieron inhibición de IL-13 en el primer estudio, *Glycyrrhiza glabra* (Regaliz) y *Sanguisorbae officinalis* exhibieron la inhibición más significativa también en este ensayo.

30 Ejemplo 7

Selección de extractos herbarios que tienen efecto inhibitor sobre IL-13 para determinar su actividad como estimulantes de beta-defensina 3 humana

Materiales y procedimientos experimentales

Véase el Ejemplo 2, más atrás en la presente memoria.

35 Resultados

40 Entre los cuatro extractos herbarios que exhibieron inhibición de IL-13 significativa en el primer estudio (véase el Ejemplo 3, más atrás), dos extractos también habían exhibido efecto estimulante sobre la beta-defensina-3 humana (hBD-3) cuando se consideró su efecto directo antes y después de la normalización por GAPDH (medido por RT-PCR), a saber, *Silybum marianum* y *Sanguisorbae officinalis*. Los extractos de *Glycyrrhiza glabra* (Regaliz) y *Cimicifuga racemosa* no exhibieron ningún efecto significativo. El extracto de *Sanguisorbae officinalis* exhibió el efecto de estimulación más significativo sobre la beta-defensina (Figuras 14A-D). Los valores se resumen en la Figura 14E y en la Tabla 5, a continuación. 3.

Tabla 5: El efecto de los extractos herbarios sobre hBD3 (después de la normalización para GAPDH)

Muestra de prueba	testigo	n.º 1	n.º 2	n.º 3	n.º 4
Nivel de expresión	1	0,072685	0	5,867937	27,43561

La identificación del material de prueba es la siguiente: 1. *Glycyrrhiza glabra*; 2. *Cimicifuga racemosa*; 3. *Silybum marianum*; 4. *Sanguisorbae officinalis*.

5 Resumen

El propósito de este estudio fue determinar si los materiales de prueba que se halló que inhibían la liberación de IL-13 en el primer estudio (véase el Ejemplo 3, más atrás) podían estimular también la expresión de beta-defensina 3 a partir de queratinocitos (células HaCaT). En el primer estudio (véase el Ejemplo 3, más atrás) se halló que cuatro extractos herbarios reducían significativamente la cantidad de IL-13 liberada. Entre ellos, *Silybum marianum* también exhibió efecto de estimulación sobre beta-defensina 3 (5,87 veces) y *Sanguisorbae officinalis* exhibió el efecto estimulante más significativo (27,4 veces) sobre beta-defensina 3.

Ejemplo 8

Sinergia entre extractos herbarios

Materiales y procedimientos experimentales

15 Véanse los Ejemplos 1 y 2, más atrás en la presente memoria.

Resultados

El efecto sinérgico entre los extractos herbarios se midió mediante ELISA para determinar la actividad de inhibición de IL-13 y mediante RT-PCR para determinar la actividad de estimulación de defensina-3.

La reducción en la liberación de IL-13 se observó con las siguientes combinaciones de hierbas: 1 + 2 + 4 (1. *Glycyrrhiza glabra*; 2. *Cimicifuga racemosa*; 4. *Sanguisorbae officinalis*) y 1 + 3 + 4 (1. *Glycyrrhiza glabra*; 3. *Silybum marianum*; 4. *Sanguisorbae officinalis*) — cuando los materiales de prueba estaban presentes a una concentración total de 0,3 %. Sin embargo, cuando se comparó con la inhibición de cada extracto herbario solo, no se demostró ningún efecto sinérgico significativo (Figura 15A). Cuando las concentraciones de los materiales de prueba se redujeron hasta 0,01 % (solos o en combinación entre sí), no se observó una reducción significativa en la liberación de IL-13 (no se muestran los datos). El efecto sinérgico de extractos herbarios sobre la estimulación de beta-defensina 3 se muestra en las Figuras 15B y 15C. El extracto de *Sanguisorbae officinalis* ha demostrado un efecto sinérgico con *Ailanthus altissima* (Figura 15B) y también con *Galla rhois gallnut* (Figura 15C).

Resumen

El propósito de este estudio fue determinar si los materiales de prueba comprenden actividad sinérgica sobre las actividades de inhibición de IL-13 o estimulación de beta-defensina 3. Se evaluaron las mezclas herbarias para determinar su capacidad para inhibir la liberación de IL-13 en células KU812. Las mezclas inhibieron la liberación de IL-13. Cuando se midieron para determinar la estimulación de la expresión de beta-defensina 3 en queratinocitos HaCaT, se observó sinergia entre (1 %) *Ailanthus altissima* con (0,33 %) *Sanguisorbae officinalis*. La actividad de *Ailanthus altissima* se elevó en 2 veces con la adición de 0,33 % de extracto de *Sanguisorbae officinalis*.

35 También se observó sinergia entre (1 %) *Galla rhois* y (0,33 %) *Sanguisorbae officinalis*. La actividad de estimulación de (1 %) *Galla rhois* se elevó mediante la adición de *Sanguisorbae officinalis* de 175 % a 280 %.

Ejemplo 9

Optimización de los extractos

Materiales y procedimientos experimentales

40 Enriquecimiento de los ingredientes activos/Cromatografía en resina

Según se describió en el Ejemplo 2, más atrás en la presente memoria.

Inhibición de IL-13

Según se describió en el Ejemplo 1, más atrás en la presente memoria.

Estimulación de beta-defensina

Según se describió en el Ejemplo 2, más atrás en la presente memoria.

Actividad antimicrobiana de los extractos herbarios

Se analizaron los extractos herbarios para determinar su actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli* resistente a ampicilina utilizando el ensayo antimicrobiano de difusión en papel, según se describió anteriormente. En resumen, se cargaron 0,2 ml (2 mg/ml) de 25 extractos herbarios en agua seleccionados sobre discos de papel. La resistencia de *E. coli* se confirmó mediante la adición de ampicilina diluida a concentraciones de 0-50 µg/ml. Los discos se cargaron sobre placas de agar con un recubrimiento de agar que contenía *S. aureus* y *E. coli* resistente a Amp. Las actividades antimicrobianas se examinaron mediante el aspecto de una zona transparente (zona de muerte) alrededor del disco.

10 Resultados

Enriquecimiento de ingrediente activo en extractos vegetales

El enriquecimiento del ingrediente activo como se describe en la presente invención utiliza de forma ventajosa resinas macroporosas que absorben, enriquecen y purifican de forma eficaz los ingredientes activos en los extractos herbarios. Este procedimiento extrae las sales orgánicas y metales pesados y, además, extra grandes cantidades de almidón, por lo tanto, mejora la estabilidad del producto, extiende la vida útil del producto y resulta en mejores actividades del extracto. Se utilizan resinas con diferentes parámetros de estructura porosa (tamaño de poro, relación entre poros y áreas superficiales específicas) y diferentes polaridades (sin polaridad, polaridad baja, polaridad media y polaridad alta).

15

Enriquecimiento del extracto - Cromatografía en resina

La eficacia del extracto herbario depende en su mayor parte de la concentración de los ingredientes activos. La producción comercial de extractos muy concentrados es un proceso complicado que resulta con frecuencia en sedimentos y estandarización complicada. Por otro lado, la cromatografía en resina resulta en una concentración reducida de impurezas (residuo después de la evaporación) y niveles elevados de ingredientes activos relevantes para el tratamiento, que permiten una eficacia biológica elevada y una estandarización mejor.

20

Por lo tanto, los presente inventores han desarrollado un método de extracción que utiliza resina de macroespora para los extractos herbarios que exhibieron eficacia elevada como inhibidores de IL-13 o como estimulantes de defensina. Los extractos herbarios y sus ingredientes activos que se eligieron como marcadores se presentan en la Tabla 6, a continuación. Los extractos herbarios hallados inicialmente como inhibidores de IL-13 ya se habían optimizado mediante cromatografía en resina en los estudios *in-vitro* descritos anteriormente y presentados en las Figuras 14A-E y 15A-C.

25

30

Tabla 6: Ingredientes activos de extractos herbarios (marcadores)

Hierba	Marcador (ingrediente activo)
Corteza de <i>Ailanthus altissima</i>	Ailantona, Mersosina, Toosendanina
<i>Cimicifuga racemosa</i>	Ginsenoid general
Agalla de <i>Galia rhois</i>	Ácido gálico, Ácido tánico
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Liquiritina
<i>Peucedanum praeruptorum</i>	Praeruptorina A
<i>Sanguisorbae officinalis</i>	Ácido tánico
<i>Silybum marianum</i>	Silibina

Optimización de extractos herbarios que exhiben eficacia elevada como estimulantes de defensina o como inhibidores de IL-13. El tipo de marcador y se resina se eligió para cada extracto herbario.

35 Inhibición de IL-13 antes y después de la optimización del extracto

Las hierbas halladas inicialmente como estimulantes de beta-defensina también se optimizaron utilizando cromatografía en resina y su capacidad para inhibir la liberación de IL-13 se detectó y comparó con la actividad de los extractos antes de la optimización. La comparación entre la capacidad de los extractos herbarios para inhibir IL-13 antes y después de la optimización con cromatografía en resina se presenta en la Figura 16 y en Tabla 7, más adelante. Por lo tanto, los resultados muestran que la cromatografía en resina elevó la actividad biológica de los

40

extractos herbarios (2 veces para el extracto de *Ailanthus altissima*, 1,13 veces para el extracto de *Galla rhois gallnut* y 36 veces para el extracto de *Peucedanum praeruptorum*).

Tabla 7: comparación de la actividad de inhibición de IL-13 de los extractos herbarios antes y después de la optimización por cromatografía. Se indican los números/letras de los extractos según la figura 16

5

Extracto herbario	% de inhibición de IL-13 antes de la optimización	% de inhibición de IL-13 después de la optimización
<i>Ailanthus altissima</i>	31,8 % (A)	87 % (1)
<i>Galla rhois gallnut</i>	83 % (B)	93,6 % (2)
<i>Peucedanum praeruptorum</i>	0,8 % (C)	28,8 % (3)

Actividad antimicrobiana de los extractos herbarios

Además, se analizaron los extractos herbarios para determinar su actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli* resistente a ampicilina. Los presentes inventores utilizaron el ensayo antimicrobiano de difusión en papel para evaluar 25 extractos herbarios seleccionados. En primer lugar, se confirmó la resistencia de *E. coli* mediante la adición de ampicilina diluida a concentraciones de 0-50 mg/ml. Como se esperaba, el *E. coli* resistente a ampicilina exhibió una supervivencia alta incluso después del tratamiento con 50 mg/ml de ampicilina. A continuación, se evaluó el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* resistente a ampicilina en presencia de los extractos herbarios (véanse la Tabla 8 a continuación y las Figuras 17A-B). Como se muestra en la Tabla 8 y en las Figuras 17A-B, los extractos de *Galla rhois gallnut* y *Terminariae fructus* exhibieron actividades antimicrobianas elevadas contra *S. aureus* y *E. coli* resistente a ampicilina, mientras que el extracto de *Coptidis rhizome* solo inhibió a *E. coli*.

Tabla 8: comparación de la actividad antimicrobiana de los extractos herbarios

n.º	Nombre de las hierbas	Contra <i>S. aureus</i>	Contra <i>E. coli</i> (resistencia a Amp)
Testigo positivo	50 ug/ml Amp	+++++	+
Testigo positivo	5 ug/ml Amp	++++	-
Testigo positivo	0,5 ug/ml Amp	++	-
Testigo negativo	D.W.	-	-
n.º 2	<i>Terminariac Fructus</i>	++	++
n.º 232	<i>Galla rhois</i>	+	+
n.º 352	<i>Coptidis Rhizoma</i>	-	+++

Mezcla de hierbas final

Los extractos que exhibieron la actividad más significativa como inhibidores de IL-13 o como estimulantes de defensina se eligieron para el desarrollo del producto final.

Los extractos herbarios que exhibieron estimulación de beta-defensina significativa fueron: *Ailanthus altissima*, *Galla rhois gallnut* y *Peucedanum praeruptorum*. Tanto *Ailanthus altissima* como *Galla rhois gallnut* también exhibieron actividad de inhibición de IL-13 significativa.

Los extractos herbarios que exhibieron la actividad inhibidora de IL-13 más significativa en el ensayo primario fueron: *Glycyrrhiza glabra*, *Cimicifuga racemosa*, *Silybum marianum* y *Sanguisorbae officinalis*. *Sanguisorbae officinalis* también había exhibido actividad de estimulación de beta-defensina 3 significativa y exhibió, además, efecto sinérgico con los extractos de *Ailanthus altissima* y *Galla rhois gallnut*.

Por lo tanto, la mezcla de hierbas final de la presente descripción comprende: *Ailanthus altissima*, *Sanguisorbae officinalis*, *Glycyrrhiza glabra* y *Cimicifuga racemosa*.

Certificado de análisis (CoA)

Se elaboró un certificado de análisis (CoA) para los extractos herbarios que contenían la mezcla final. Las principales características de los extractos herbarios se presentan en la Tabla 9, a continuación.

- 5 El CoA representa valores del ingrediente activo (marcador), residuo después de la evaporación y pH para cada extracto herbario después de la optimización del extracto utilizando cromatografía en resina macroporosa. Los metales pesados exhibieron valores <20 ppm para todos los extractos herbarios. Se llevaron a cabo análisis microbiológicos para cada extracto, donde el recuento final fue de < 10²/g, los mohos y levaduras < 10²/g y Salmonella y E. coliform fueron negativos para todos los extractos herbarios evaluados.

Tabla 9: CoA para los extractos herbarios finales en la mezcla

Naturaleza de la prueba	<i>Ailanthus altissima</i>	<i>Sanguisorbae officinalis</i>	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	<i>Cimicifuga racemosa</i>
Características				
- Aspecto - Color	Líquido pegajoso marrón oscuro	Líquido pegajoso marrón oscuro	Líquido pegajoso marrón oscuro	Líquido pegajoso marrón oscuro
- Olor	Herbario característico	Herbario característico	Herbario característico	Herbario característico
- Densidad a 25 °C, g/ml	1,02	1,04	1,02	1,02
- valor de pH	6,1	5,4	6,1	5,7
Pruebas				
- Metales pesados,	<20 ppm	<20 ppm	<20 ppm	<20 ppm
- Residuo después de la evaporación	14,2 %	26,1 %	18,2 %	19,3 %
Ensayo HPLC	Ailantona/ Mersosina 0,75 mg/ml/ Toosendanina 0,01mg/ml	Acido gálico 0,04 mg/ml/ Ácido tánico 62,3 mg/ml/	Liquiritina 4,1 mg/ml	Ginsenósido general 51,6 mg/ml
Análisis microbiológicos				
- Recuento total de placa	< 10 ² / g	< 10 / g	< 10 / g	< 10 / g
- Levaduras y	< 10 ² / g	< 10 / g	< 10 / g	< 10 / g
Mohos				
- Salmonella	Negativo en 1 g	Negativo en 1 g	Negativo en 1 g	Negativo en 1 g
- E. coliform	Negativo en 1 g	Negativo en 1 g	Negativo en 1 g	Negativo en 1 g

10

Formulación de producto

Los presentes inventores desarrollaron una formulación A/A que contenía la mezcla de extractos herbarios elegida. Además de la eficacia del extracto herbario, la formulación se desarrolló para humectar la piel seca relacionada con pacientes con dermatitis atópica, por lo tanto, la formulación también contiene sustancias emolientes y humectantes.

- 15 Se asignó al producto un pH de aproximadamente cinco, un nivel similar a la piel normal. Los productos tópicos que tienen el pH de la piel normal respaldan la integridad del estrato córneo y la formación y maduración de las lamelas lipídicas. El valor del pH tiene una función importante en los pacientes con dermatitis atópica, particularmente en relación con la función de barrera de la piel y la colonización por *Staphylococcus aureus*.

Ejemplo 10

- 20 Ensayos clínicos

Materiales y procedimientos experimentales

SCORAD

5 El grado de la DA se evaluó mediante el índice SCORAD, una herramienta clínica que se utiliza para evaluar la extensión y gravedad del eccema (SCORing Atopic Dermatitis), según se describió anteriormente [Oranje AP et al., Br J Dermatol. (2007) 157(4):645-8; Oranje AP, Curr Probl Dermatol. (2011) 41:149-55]. Los dermatólogos típicamente utilizan el SCORAD antes y después del tratamiento para determinar si el tratamiento ha sido eficaz.

Los parámetros del SCORAD son:

Extensión

10 Para determinar la extensión, los sitios afectados por el eccema típicamente se marcan en un dibujo de un cuerpo. La regla de 9 se utiliza para calcular el área afectada (A) como un porcentaje de todo el cuerpo, de la siguiente forma: Cabeza y cuello 9 %, extremidades superiores 9 % cada una, extremidades inferiores 18 % cada una, tronco anterior 18 %, espalda 18 % y 1 % para cada uno de genitales, cada palma y parte posterior de cada mano.

Se suma la puntuación de cada área. El área total es «A», que tiene un máximo posible de 100 %.

Intensidad

15 Se selecciona un área representativa del eccema. En esta área se evalúa la intensidad e cada uno de los siguientes signos como ninguno (0), leve (1), moderado (2) o grave (3), a saber: Enrojecimiento, hinchazón, exudación/formación de costra, marcas de rasguños, engrosamiento de la piel (liquenización) y sequedad (se evalúa en un área donde no hay inflamación).

Las puntuaciones de intensidad se suman para proporcionar «B» (máximo 18).

Síntomas subjetivos

20 Los síntomas subjetivos, es decir, la picazón y el insomnio, reciben puntuaciones dadas por el paciente o pariente que utiliza una escala visual análoga donde 0 es sin picazón (o sin insomnio) y 10 es la peor picazón imaginable (o insomnio). Estas puntuaciones se suman para proporcionar «C» (máximo 20).

Puntuación total

El SCORAD para un individuo es $A/5 + 7B/2 + C$.

25 Composición para ensayo clínico

30 Los sujetos que participaron en el ensayo clínico (véanse los detalles adicionales más adelante) recibieron tratamiento con vehículo, un producto que contiene extractos herbarios que reduce el prurito e hidratantes que hidratan la piel para permitir el tratamiento de los síntomas leves y moderados de la DA, o con loción de tratamiento que además de los ingredientes utilizados en la loción de vehículo también contenía dos extractos herbarios adicionales: extracto de raíz de *Sanguisorba officinalis* y extracto de *Ailanthus altissima* (véase la Tabla 10 para una formulación de loción de tratamiento de ejemplo utilizada en un ensayo clínico). La loción de vehículo también contenía dos extractos que inhibían IL-13.

Tabla 10: Una formulación de loción corporal de tratamiento de ejemplo

Nombre en INCI	n.º de página de 9ª ed. de INCI	n.º CAS
Agua	1795	7732-18-5
Vaselina	12ª Ed. 1983	8009-03-8
Glicerina	666	56-81-5
Butyrospermum Parkii (Manteca de karité)	12ª Ed. 365	68920-03-6
Aceite mineral	12ª Ed. 1597	8012-95-1
Triglicérido caprílico/cáprico	252	65381-09-1
Alcohol cetearílico y glucósido cetearílico	12ª Ed. 476	8005-44-5
Alcohol cetílico y	12ª Ed. 479	

ES 2 645 245 T3

Acetato de estearilo y	12ª Ed. 2663	822-23-1
Acetato de oleilo y	12ª Ed. 1719	693-80-1
Alcohol de lanolina acetilado	12ª Ed. 15	61788-49-6
Alcohol cetílico	12ª Ed. 492	36653-82-4
Etilhexanoato de cetearilo	12ª Ed. 478	
Alcohol cetearílico	12ª Ed. 476	8005-44-5
Glicirrizato dipotásico	545	68797-35-3
Ceramida 3 y	12ª Ed. 461	100403-19-8
Ceramida 6 II y	12ª Ed. 462	100403-19-8
Ceramida 1 y	12ª Ed. 460	100403-19-8
Fitosfingosina y	12ª Ed. 2014	544-62-1
Colesterol y	12ª Ed. 523	57-88-5
Lactilato de lauroilo sódico y	12ª Ed. 2546	133557-75-0
Carbómero y	12ª Ed. 429	9003-01-4
Goma xanatana	12ª Ed. 2975	11138-66-2
Estearato de glicerilo y	12ª Ed. 1080	123-94-4
Estearato de PEG-100	12ª Ed. 1944	9004-99-3
Extracto de raíz de Rheum palmatum	2067	90106-27-7
Extracto de fruto de Cnidium Monnieri	12ª Ed. 626	484-12-8
Extracto de raíz de Scutellaria Baicalensis	12ª Ed. 2444	94279-99-9
Extracto de raíz de Sanguisorba Officinalis		84787-71-3
Extracto de Ailanthus Altissima		90131-67-2
Ácido deshidroacético y	12ª Ed. 749	520-45-6
Alcohol bencílico	12ª Ed. 271	100-51-6
Estearato de sacarosa		25168-73-4
Dimeticona	12ª Ed. 814	9006-65-9
Pentadecalactona y	12ª Ed. 1960	106-02-5
Citrato de trietilo	12ª Ed. 2806	77-93-0
Goma xanatana	12ª Ed. 2975	11138-66-2
Sorbato de potasio	12ª Ed. 2177	590-00-1
Acetato de tocoferilo	12ª Ed. 2778	58-95-7
Ácido láctico	12ª Ed. 1378	50-21-5
Ácido hialurónico	12ª Ed. 1177	9004-61-9

Sujetos

Criterios de inclusión:

5 Los criterios de inclusión para participar en el presente ensayo clínico fueron los siguientes: mujeres y hombres mayores de 18 años; el diagnóstico de dermatitis atópica debe satisfacer os criterios de Hanifin (al menos 3 rasgos básicos y al menos 3 rasgos menores); la dermatitis atópica, en opinión de los inventores, ha sido estable en los últimos 7 días; sin recrudescencia en los últimos 5 días; capacidad para aplicarse el producto del estudio al menos dos veces a día (todas las mañanas y noches) durante un período de 21 días; los sujetos que acuerdan no cambiar su estilo de vida durante el período del estudio (incluido sus productos de higiene corporal habituales (jabón), la cantidad de baños y duchas por día, el detergente y el suavizante de telas utilizados para el lavado de la ropa); los sujetos que acuerdan usar solo el producto de prueba durante el período del estudios y los sujetos que desean firmar un consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

15 Los criterios de exclusión para participar en el presente ensayo clínico fueron los siguientes: el sujeto padece otra enfermedad/afección dermatológica que podría interferir con la evaluación clínica, incluidas lesiones de dermatitis atópica infectadas; el sujeto tiene antecedentes de alergia a productos cosméticos o cualquier ingrediente en las formulaciones evaluadas; el sujeto ha recibido cualquier inmunomodulador tópico o sistémico para la dermatitis atópica (tal como pimecrolimus o tacrolimus) o esteroides en los 14 días anteriores al Día 0; el sujeto ha recibido fototerapia en los 28 días anteriores al Día 0; tiempo de exposición solar prolongado durante el ensayo; el sujeto ha utilizado cualquier tratamiento experimental en los 14 días anteriores al Día 0; y mujeres embarazadas o en período de lactancia.

La participación fue voluntaria. Los inventores proporcionaron una copia del formulario de consentimiento informada a cada participante.

Los sujetos tuvieron 3 visitas clínicas programadas durante el estudio:

1. Evaluación de selección/valor inicial (Día 0)
- 25 2. Visitas de seguimiento el Día 7 y el Día 14
3. Visita de finalización el Día 21

(Se permitió una flexibilidad de ± 2 debido a la disponibilidad del paciente).

30 El Día 7, Día 14 y Día 21 (± 2 días), los sujetos volvieron a la clínica para una evaluación. Se hicieron las siguientes evaluaciones: Extensión, edema, eritema, prurito, liquenización, exudación, insomnio y sequedad. En función de estas mediciones se calculó el SCORAD y se hicieron evaluaciones de la infección secundaria.

En la primera y última visita, se aplicaron las pruebas de TEWL e hidratación de la piel.

El estudio se llevó a cabo según las normas internacionales que cumplen con las reglamentaciones en relación con las buenas prácticas clínicas (GCP, por sus siglas en inglés).

35 Todos los pacientes recibieron información sobre los objetivos, los métodos, los beneficios anticipados, los posibles riesgos y la confidencialidad de los datos. También se dijo a los candidatos que eran libres de negarse a participar en cualquier momento.

Evaluación de pacientes

Medida de resultado primario:

40 El SCORAD incluía los síntomas de DA clasificados: extensión, edema, exudación, excoriación, liquenización, eritema, prurito, sequedad e insomnio [Período de tiempo: Día 0, Día 7, Día 14 y Día 21].

Medida de resultados secundarios:

1. TEWL y prueba de hidratación [Período de tiempo: Día 0 y Día 21].
2. Cantidad y clasificación de infecciones secundarias
3. Cantidad de eventos adversos [Período de tiempo: Día 0, Día 7, Día 14 y Día 21].

45

Resultados

Características demográficas y de DA iniciales

50 sujetos en total participaron en el estudio (es decir, se llevaron a cabo dos estudios de forma simultánea que comprendían 30 sujetos tratados con loción de tratamiento y 20 sujetos tratados con loción de vehículo, véase el resumen en la Tabla 11, a continuación). Treinta pacientes recibieron tratamiento con loción de tratamiento y 20 pacientes recibieron tratamiento con el vehículo durante 21 días. La edad media fue similar en ambos grupos. Aunque hubo diferencias de género entre ambos grupos (Tabla 11), la gravedad de DA inicial en ambos grupos, según se midió mediante SCORAD, fue similar (Tabla 12, a continuación). Además, la proporción de subpoblaciones de pacientes con DA con síntomas graves (SCORAD > 50) fue también idéntica en ambos grupos (25 % en el grupo con vehículo y 26,7 en el grupo con tratamiento) (véase la Tabla 12 a continuación).

Tabla 11: Características demográficas de ambos grupos

Característica	Testigo (grupo con vehículo)	Tratamiento (grupo con tratamiento)
Cantidad	20	30
Edad, y (DT)	45 (13)	48 (15)
Mujeres, n.º (%)	5 (25)	28 (93)
Hombres, n.º (%)	15 (75)	2 (7)

Tabla 12: Valores iniciales de SCORAD

Gravedad de AD	Testigo (grupo con vehículo)	Tratamiento (grupo con tratamiento)
SCORAD total		
Cantidad de sujetos	20	30
SCORAD (DT)	41 (12)	42 (12)
SCORAD leve a moderado < 50		
Cantidad de sujetos (%)	15 (75 %)	22 (73,3 %)
SCORAD (DT)	33 (9)	37 (9)
SCORAD grave > 50		
Cantidad de sujetos (%)	5 (25 %)	8 (26,7 %)
SCORAD (DT)	53 (3)	57 (4)

15 Análisis de resultados de SCORAD

Se observó una diferencia significativa entre el SCORAD de los grupos con vehículo y tratamiento en los Días 14 y 21 (para ambos $P < 0,001$) en comparación con los valores iniciales (véase la Figura 18) que indicaron una reducción eficaz en el aspecto de la DA mediante ambas preparaciones.

20 No se halló una diferencia global en el SCORAD entre los grupos. Después de 3 semanas, la puntuación media del grupo de tratamiento fue ligeramente más baja que la del grupo con vehículo ($p = 0,087$). Sin embargo, un análisis más exhaustivo de los parámetros individuales, como se muestra a continuación, revela cambios significativos.

Análisis de los principales componentes de SCORAD

25 Los principales componentes de SCORAD (extensión, intensidad, subjetivos) se analizaron por separado en los grupos con vehículo y tratamiento para determinar su contribución a la reducción significativa del SCORAD total en el tiempo (Figuras 19 y 20, respectivamente).

El gráfico de la Figura 19 demuestra la estabilidad del parámetro de extensión en el grupo con vehículo durante el estudio. Este componente no afecta el cambio en la puntuación SCORAD total. Por otro lado, el cambio en los parámetros de intensidad y subjetivos en los Días 14 y 21 fue muy significativo ($P < 0,001$ y $P < 0,01$, respectivamente) cuando se comparó con el inicio.

5 Los mismos resultados se obtuvieron en el grupo con tratamiento (véase la Figura 20). La extensión no contribuyó al cambio en el valor de SCORAD total. Los parámetros de intensidad y subjetivos se redujeron en los Días 14 y 21 (para ambos $P < 0,001$) cuando se compararon con los valores del inicio.

10 El parámetro de intensidad es una suma de puntuaciones de seis síntomas de DA. La diferencia global en el parámetro de intensidad y, específicamente, la diferencia entre los grupos el Día 21 fue muy significativa (Figura 21, $P < 0,01$).

En cambio, no se observaron diferencias entre los grupos en los parámetros subjetivos compuestos por la suma de la puntuación de los síntomas de prurito e insomnio, según los evalúan los sujetos (Figura 22).

15 Estos resultados tomados en conjunto muestran que el cambio en los parámetros de intensidad y subjetivos en los Días 14 y 21 fue muy significativo en cada grupo cuando se comparó con el inicio. La extensión permaneció estable en ambos grupos durante el estudio y, por lo tanto, redujo la significancia de la reducción del SCORAD total. Aunque no se halló un cambio significativo en el parámetro de extensión, la gravedad de las lesiones en cada una de las áreas medidas se redujo significativamente, como se muestra mediante la reducción en el parámetro de intensidad. La comparación entre los grupos después de 21 días reveló una reducción muy significativa en la intensidad después del tratamiento con la loción corporal de tratamiento (52 % con respecto a 32 % en el grupo con vehículo, Figura 21). No se observó una diferencia significativa en la reducción relativa del parámetro subjetivo (55 % en el grupo con tratamiento con respecto a 42 % en el grupo con vehículo, Figura 22).

Análisis de los componentes de intensidad individuales

25 Un análisis de resolución más alta de los componentes individuales de la intensidad (eritema, edema, exudación, excoriación, liquenización y sequedad) mostró que un porcentaje sustancial de pacientes con DA experimentó una mejoría significativa en los síntomas en ambos grupos de tratamiento. El análisis se hizo solamente basado en los datos tomados de sujetos que experimentaban los síntomas. Como ilustran los resultados, dos síntomas comunes en la DA leve-moderada, eritema y sequedad, mejoraron en más del 70 % de los pacientes (Figura 23).

30 La diferencia entre las puntuaciones de exudación, excoriación, liquenización y sequedad fue significativamente diferente desde el inicio hasta el Día 21 (véase la Tabla 13 a continuación, $P < 0,01$). La puntuación de eritema mejoró significativamente también el Día 14 ($P < 0,02$).

Tabla 13: Cambio en las puntuaciones (% media) de síntomas individuales en el grupo con vehículo

	Eritema	Edema	Exudación	Excoriación	Liquenización	Sequedad
Día 7	0 %	0 %	-3 %	3 %	3 %	2 %
Día 14	18 $P < 0,02$	27 %	17 %	25 %	15 %	13 %
Día 21	34 $P < 0,001$	27 %	39 $P < 0,01$	23 $P < 0,001$	28 $P < 0,001$	34 $P < 0,001$

La loción corporal de tratamiento fue más eficaz que la loción corporal de vehículo y redujo significativamente todos los síntomas en más del 70 % de los pacientes después de 21 días (Figura 24).

35 De forma interesante, el síntoma de exudación, asociado a infecciones secundarias, mejoró un 86 % en 93 % de los sujetos (véanse la Figura 24 y la Tabla 14 a continuación). La diferencia entre las puntuaciones el Día 14 y el Día 21 con respecto al inicio fue muy significativa ($p < 0,001$) en todos los síntomas excepto en edema, que fue significativamente diferente solo el Día 21 ($p < 0,02$).

Tabla 14: Cambio en las puntuaciones (% media) de síntomas individuales en el grupo con tratamiento

	Eritema	Edema	Exudación	Excoriación	Liquenización	Sequedad
Día 7	0 %	2 %	16 %	0 %	3 %	1 %
Día 14	27 P<0,001	23 %	52 P<0,001	22 P<0,008	22 P<0,003	26 P<0,001
Día 21	37 P<0,001	50 P<0,02	86 P<0,001	53 P<0,02	53 P<0,001	40 P<0,001

5 Una comparación entre los grupos con vehículo y tratamiento reveló un efecto reductor ampliamente superior de la loción corporal de tratamiento sobre la gravedad de los síntomas de DA. Una cantidad muy significativa de pacientes con DA experimentó una mejoría en la condición de DA, según la evaluación de los presentes inventores (Figura 25).

El grupo con tratamiento exhibió un grado sustancialmente mayor de mejoría en la exudación en comparación con el grupo con vehículo (véase la Tabla 15, a continuación).

10 Tabla 15: Una comparación entre el cambiar en la intensidad de los síntomas en los grupos con vehículo y tratamiento después de 21 días de tratamiento.

	Eritema	Edema	Exudación	Excoriación	Liquenización	Sequedad
Grupo con vehículo	34 %	27 %	39 %	23 %	28 %	34 %
Grupo con tratamiento	37 %	50 %	86 %	53 %	53 %	40 %
P<	NS	0,02	0,001	0,003	0,03	NS

15 Por lo tanto, el beneficio más significativo de la loción corporal de tratamiento con respecto al vehículo se demostró en la reducción de la intensidad del edema (50 % con respecto a 27 %), exudación (86 % con respecto a 39 %), excoriación (53 % con respecto a 23 %) y liquenización (53 % con respecto a 28 %), después de 21 días de tratamiento (véase la Tabla 15).

Análisis de los componentes subjetivos individuales

El análisis se hizo solamente basado en los datos tomados de sujetos que indicaron que experimentaban los síntomas.

20 Se observó una reducción significativa en el prurito (P<0,001), inducida por la loción corporal de vehículo, aunque no afectó el insomnio en los pacientes, que fue muy bajo en el inicio (media=1,6) (véase la Figura 26).

En el grupo con tratamiento, se alcanzó la significancia en la reducción del prurito y el insomnio (véase la Figura 27, P<0,001). Además, la puntuación media del inicio para el insomnio fue más alta en comparación con el grupo con vehículo (media=2,6).

25 Cuando se compararon, no se halló una significancia entre el prurito y la reducción en el insomnio entre los dos grupos después de 21 días (véase la Figura 28). A pesar de una reducción media más alta del insomnio en el grupo con tratamiento, el tamaño pequeño de la muestra tuvo un papel limitante para alcanzar una diferencia significativa.

Dado que ambos grupos tratados con tratamiento y vehículo exhibieron reducción significativa en el prurito sin un cambio significativo entre los dos grupos, la capacidad de las lociones para reducir el prurito se consideró, por lo tanto, como basada principalmente en la actividad del vehículo.

30 Efecto del tratamiento sobre la AD grave

Los cambios en el SCORAD se analizaron en subpoblaciones de sujetos con AD con aspecto grave (SCORAD>50) y no grave (leve a moderado, SCORAD<50) de la afección en la visita de inicio.

Cuando se comparó la eficacia de las lociones en el tratamiento de los pacientes con DA leve a moderada (SCORAD<50), la eficacia de la loción corporal de tratamiento fue 35 % más alta que la de vehículo (46 % con

respecto a 34 %), mientras que la eficacia de la loción corporal de tratamiento para tratar la DA grave (SCORAD>50), típicamente acompañada por infecciones secundarias, fue tanto como 50 % más alta que la del vehículo (42 % con respecto a 21 %, véase la Figura 29).

- 5 Tomados en conjunto, los resultados muestran de forma clara el efecto superior de la loción corporal de tratamiento sobre los síntomas de la DA, en particular sobre los síntomas relacionados con la DA grave y con infecciones secundarias.

Nivel de humectación

El nivel de humectación es una indicación de la capacidad de la loción para proporcionar una barrera mecánica y mantener la humedad de la piel. Se evaluó mediante 2 métodos:

- 10 TEWL- medición de la evaporación a través de la piel

Hidratación de la piel - la cantidad de líquido retenida en la piel.

Las mediciones se llevaron a cabo en la visita de inicio y en el día 21.

- 15 Los resultados demostraron diferencias significativas entre las mediciones del inicio y del día 21 en la humedad de la piel en ambos grupos (Véase la Figura 30, $P < 0,001$). Ambas lociones mejoraron la humedad de la piel en la misma medida.

Ejemplo 11

Caracterización del componente activo estimulante de beta-defensina 3 humana de *Ailanthi radicis*

- 20 El fraccionamiento guiado por bioensayo clásico se ha reconocido como un proceso tedioso y laborioso para el estudio de productos naturales en el campo de la química. En la última década, con las mejoras en la técnica analítica, se han desarrollado estrategias más eficaces para determinar los productos naturales biológica y farmacológicamente activos, incluida la elaboración de perfiles de actividad acoplada a HPLC. Esta técnica con HPLC se ha conocido como una estrategia miniaturizada eficaz que se puede aplicar de forma directa a mecanismos y ensayos basados en células.

Materiales y procedimientos experimentales

- 25 Cultivo celular de HaCaT: Los queratinocitos humanos (HaCaT) se cultivaron en medios DEMD que contenían suero fetal bovino (FBS) al 10 % y antibióticos/antimicóticos (penicilina G, estreptomycin, anfotericina B), a 37,0 °C y 5 % de CO₂.

- 30 Preparación del extracto de *Ailanthi radicis*: La *Ailanthi radicis* seca se extrajo con agua hirviendo durante 3 horas y el extracto de agua caliente se liofilizó a -60 °C a presión reducida. El extracto liofilizado se suspendió en H₂O y se particionó de forma sucesiva con acetato de etilo (EtOAc), alcohol butílico (n-BuOH). Todos se almacenaron a -20 °C.

Análisis de PCR en tiempo real

- 35 Se extrajo el ARN total de los queratinocitos utilizando reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. La primera cadena de ADNc se sintetizó a partir de 3 µg de ARN total con cebadores oligo(dT)₁₂₋₁₈ utilizando transcriptasa inversa SuperScript II RNase H (Invitrogen Life Technologies). Además, para retirar el ARN complementario para el ADNc, se agregaron 2 U de RNase H (Invitrogen Life Technologies) a las mezclas de reacción, que después se incubaron a 37 °C durante 20 min. La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). La amplificación y detección del ARNm de beta defensina 3 humana se analizó mediante un sistema de PCR en tiempo real (modelo 7500; Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante. El cebador/sonda de beta-defensina 3 humana se obtuvo de Applied Biosystems (Assays on-Demand, Hs0015557_m1). La PCR se llevó a cabo de la siguiente forma: una etapa inicial de 50 °C durante 2 min y 95 °C durante 10 min y posteriormente 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Para estandarizar las concentraciones de ARNm de IL-18, se determinaron los niveles de transcrito del gen de mantenimiento GAPDH en paralelo para cada muestra y los niveles de transcrito de IL-18 relativos se corrigieron mediante normalización basada en los niveles de transcrito de GAPDH. Para GAPDH, los inventores utilizaron un ensayo predesarrollado (Applied Biosystems). Todos las PCR en tiempo real se hicieron por triplicado. Los cambios en la expresión génica se informaron como aumentos de nivel con respecto a los testigos no tratados.

Fraccionamiento en serie: El fraccionamiento en serie de *Ailanthi radicis* se llevó a cabo como se describe en la Figura 31.

- 50 Resultados

Entre las mezclas de hierbas, el extracto de *Ailanthi radicis* se eligió originalmente por su intensa actividad de

estimulación de beta-defensina 3 humana. Por lo tanto, los presentes inventores caracterizaron el componente activo responsable de la estimulación de la beta defensina 3 humana (DEF3) en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT, utilizando una técnica de fraccionamiento tradicional y elaboración de perfil de actividad acoplada a HPLC en combinación con PCR en tiempo real. Para identificar la estructura molecular de los componentes activos, se utilizó espectroscopia de masas y espectroscopia RMN.

ETAPA I: preparación de tres tipos de fraccionamientos basados en disolventes de extractos con agua caliente de *Ailanthi radiceis*

A partir de los extractos con agua caliente de *Ailanthi radiceis*, se prepararon 3 tipos de extracciones para la primera etapa, a saber: 1. Extracto de agua de *Ailanthi radiceis*, 2. Extracto de alcohol butílico de *Ailanthi radiceis* y 3. Extracto de acetato de etilo de *Ailanthi radiceis* (Figuras 32A-E). Todas las fracciones se liofilizaron y se volvieron a disolver en agua (en el caso de extracto de agua de *Ailanthi radiceis*) y DMSO (en el caso del extracto de alcohol butílico y el extracto de acetato de etilo de *Ailanthi radiceis*) a la concentración de 10 mg/ml. Después del tratamiento, se agregaron 10 µl de cada extracto a un cultivo celular de HaCaT a una concentración final de 100 µg/3 ml de medios de cultivo en un matraz de 6 pocillos durante 48 horas. Los cambios en el ARNm de beta-defensina 3 humana se compararon con los grupos con agua o DMSO testigo mediante análisis de PCR en tiempo real.

Los cambios en la expresión relativa de GAPDH (como testigo interno) y DEF3 en todos los grupos evaluados se ilustran en la Tabla 16, más adelante. Cuando se compararon los cambios en la expresión relativa entre GAPDH y DEF3, el extracto de acetato de etilo de *Ailanthi radiceis* y el extracto de alcohol butílico de *Ailanthi radiceis* aumentaron de forma significativa las expresiones.

Tabla 16: Expresión relativa de DEF3 a partir de fracciones basadas en disolventes de extractos con agua caliente de *Ailanthi radiceis*

Grupo	Delta Ct entre GAPDH y DEF3 (Ct de DEF3 — Ct de GAPDH)	Cambios en la expresión (nivel) en comparación con los grupos testigo
Testigo D.W.	16,57	-
Extracto con agua de <i>Ailanthi radiceis</i>	15,52	2(16,57 - 15,52)
Testigo DMSO	17,31	-
<i>Ailanthi radiceis</i> con acetato de etilo	12,84	2(17,31-12,84)
<i>Ailanthi radiceis</i> con alcohol butílico	12,8	2(17,31-12,23)

ETAPA II: 25 tipos de fraccionamiento de extracto de alcohol butílico de *Ailanthi radiceis* basados en HPLC.

El producto liofilizado (49 g) se particionó de forma sucesiva con EtOAc, nBuOH y H₂O. El extracto activo de n-BuOH (2,1 g) se almacenó a -20 °C. Para la elaboración del perfil de actividad, se fraccionó una porción (177 mg) del extracto de alcohol butílico de *Ailanthi radiceis* utilizando una HPLC semipreparativa a intervalos regulares de 2 min, basada en la siguiente condición: iniciación con 90 % H₂O de que contiene 0,1 % de HCOOH/10 % de MeOH, posteriormente un gradiente hasta 40 % de H₂O que contiene 0,1 % de HCOOH/60 % de MeOH durante 50 min, a una velocidad de flujo de 4,0 ml/min y detección UV a 254 nm. Se recogieron un total de 25 fracciones (véase la Figura 33 y la Tabla 17 a continuación).

Cada una de las 25 fracciones se agrupó, liofilizó y volvió a disolver en DMSO a la concentración de 10 mg/ml. Después del tratamiento, se agregaron 10 µl de cada extracto a un cultivo celular de HaCaT a una concentración final de 100 µg/3 ml de medios de cultivo en un matraz de 6 pocillos durante 48 horas, los cambios en el ARNm de la beta-defensina 3 humana se compararon con los grupos testigo con agua y DMSO por medio de análisis de PCR en tiempo real.

Tabla 17: Número y pesos de las 25 fracciones de extracto con alcohol butílico de *Ailanthi radidis* basados en HPLC

n.º	Peso neto de cada fracción
1	0,4 mg
2	1,6 mg
3	0,7 mg
4	0,5 mg
5	0,8 mg
6	0,6 mg
7	1,7 mg
8	1,9 mg
9	0,6 mg
10	0,3 mg
11	0,6 mg
12	0,8 mg
13	0,8 mg
14	0,9 mg
15	0,6 mg
16	1,2 mg
17	0,2 mg
18	0,9 mg
19	0,9 mg
20	0,6 mg
21	1,6 mg
22	0,7 mg
23	0,9 mg
24	0,7 mg
25	0,3 mg

Los cambios de la expresión relativa de GAPDH (como testigo interno) y DEF3 en todos los grupos evaluados se ilustra en la Figura 34. Cuando se comparan los cambios en la expresión relativa entre GAPDH y DEF3, la fracción número 12 aumentó intensamente la expresión de DEF3 en la línea de queratinocitos humanos, HaCaT.

5

ETAPA III: Caracterización de la estructura mediante RMN y espectrometría de masas de la fracción No. 12.

Aislamiento del compuesto estimulante de DEF3: Para aislar los compuestos activos del extracto con n-BuOH, se separó una alícuota (1,07 g) del extracto varias veces en la misma condición de HPLC con la elaboración del perfil de actividad indicado anteriormente para proporcionar una fracción activa que contenía el compuesto estimulante de DEF3. Este compuesto se purificó adicionalmente en un sistema de gradiente de disolvente, 80 % de H₂O que contenía 0,1 % de HCOOH/20 % de MeOH a 70 % de H₂O que contenía 0,1 % de HCOOH/30 % de MeOH durante 70 min (ta: 24,70 min, 2,2 mg).

10

Análisis de estructura por RMN: Se registraron experimentos de RMN ¹H, ¹³C y 2D en un espectrómetro de RMN

Varian VNMRS 600 MHz. La RMN LC/¹H se llevó a cabo en un espectrómetro de RMN Varian VNMRS 600 MHz (¹H: 600.006 MHz) enlazado con un sistema de HPLC Varian ProStar utilizando una sonda criógena de microflujo de triple resonancia de 150 μ L. Los espectros de RMN 1D¹H se obtuvieron en el modo de detenimiento de flujo y en el modo de flujo continuo. Para la RMN ¹H de modo de detenimiento de flujo, el método de HPLC se llevó a cabo inicialmente con 95 % de D₂O que contenía 0,1 % de HCOOH/5 % de ACN, posteriormente mediante un gradiente hasta 35 % D₂O que contenía 0,1 % de HCOOH/65 % de ACN en 35 min (tiempo total de pasada 45 min), con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min y detección de UV a 280 nm. La muestra (50 μ L) se inyectó en una columna de fase inversa SunFire™ C18 (5 μ m, 4,6x150 mm, Waters). La secuencia WET1D estándar se utilizó para la presaturación de la frecuencia de ¹H en HOD, ACN y HCOOH. Los datos se adquirieron con ancho de barrido de 9 kHz utilizando puntos de dominio de tiempo 33 K y un tiempo de adquisición de 1,82 segundos. Se utilizaron cantidades variables de barridos (128-512) para la concentración relativa de cada compuesto dentro de la celda de flujo de sonda. Los espectros de RMN ¹H se relacionaron con la resonancia de ACN (1,96 ppm). El experimento de LC-RMN de flujo continuo se llevó a cabo en la misma condición de gradiente excepto por la velocidad de flujo de 0,2 mL/min y el tiempo total de pasada de 180 min. Los espectros de RMN ¹H se recogieron mediante 32 barridos cada uno de forma continua durante la elución cromatográfica.

Los espectros de RMN ¹H exhibieron dos señales de protón metilo de H-18 y H-19 (cada una 3H, s) a δ 1,20 y 2,02, y también exhibieron señales de protón olefínico H-3 (1H, br s) a δ 6,06 y un exometileno H-21 (2H, s). Se observaron respectivamente tres señales de protón metina oxigenada, H-1, H-7 y H-12 a δ 4,26 (1H, s), 4,62 (1H, t, 2,4) y δ 3,89 (1H, s). Además, se observaron en el espectro tres señales de protón metina a δ 2,91 (H-5), 2,95 (H-9) y δ 2,84 (H-14), junto con tres señales de protón metileno a δ 2,27, 2,14 (H-6a y H-6(3)), 2,65, 3,11 (H-15a y H-15(3)) y δ 3,99, 3,49 (H-20a y H-20(3)). Las señales de carbonilo γ -lactona y α,β -insaturado se detectaron a δ 170,6 (H-16) y 197,6 (H-2), respectivamente. Su espectro de HMBC reveló que un metilo aislado de H-19 se correlacionaba con tres carbonos carbonilo de C-1, C-5 y C-10, y la señal de protón metina H-14 exhibía una correlación de intervalo grande con las señales de carbono de C-10, C-12, C-13, C-15 y C-20. Los datos de RMN ¹H, ¹³C, COSY y HMBC del compuesto estimulante de DEF3 se muestran en detalle en la Tabla 18. Los espectros de RMN de los compuestos estimulantes de DEF3 se ilustran en las Figuras 35-38. En función del análisis de la estructura de RMN, el compuesto estimulante de DEF3 del extracto de *Ailanthi radice* se identificó como **ailantona** (Figuras 39A-B).

Tabla 18 Datos de NMR de ¹⁴ y ¹³C para el compuesto estimulante de DEF3

Posición	δ_c	δ_H	COSY	HMBC (H-*C)
1	82,8	4,26 (1H, s)	H-19	C-10, 19
2	197,6	-		
3	124,7	6,06 (1H, br, s)	H-5, 18	C-1, 5, 18
4	163,5	-		
5	41,8	2,91 (1H, br d, 12,3)	H-3, 6 α , 6 β , 18	
6 α	25,3	2,27 (1H, br d, 15,0)	H-5, 7	
6 β		2,14 (1H, ddd, 15,0, 12,3, 2,4)	H-5, 7	C-5
7	78,4	4,62 (1H, t, 2,4)	H-6 β	C-5, 9
8	47,0	-		
9	43,8	2,95 (1H, s)		C-1, 8, 10, 20
10	44,4	-		
11	108,6	-		
12	79,4	3,89 (1H, s)	H-14	C-10, 11, 13, 14, 21
13	145,1	-		
14	46,5	2,84 (1H, dd, 13,8, 5,4)	H-12, 15 α , 15 β , 21	C-10, 12, 13, 15, 20
15 α	33,9	2,65 (1H, dd, 5,4, 18,6)	H-14, 15 β	C-14, 16
15 β		3,11 (1H, dd, 13,8, 18,6)	H-14, 15 α	C-13, 14, 16
16	170,6	-		

ES 2 645 245 T3

17	-			
18	21,2	2,02 (3H, s)	H-3, 5	C-3, 4, 5
19	8,3	1,20 (3H, s)	H-1	C-1, 5, 10
20 α	71,6	3,99 (1H, d, 8,1)	H-20 β	C-7, 10, 14
20 β		3,49 (1H, d, 8,1)	H-20 α	C-10, 11, 14
21	118,9	5,22 (2H, s)	H-14	C-12, 13, 14, 15

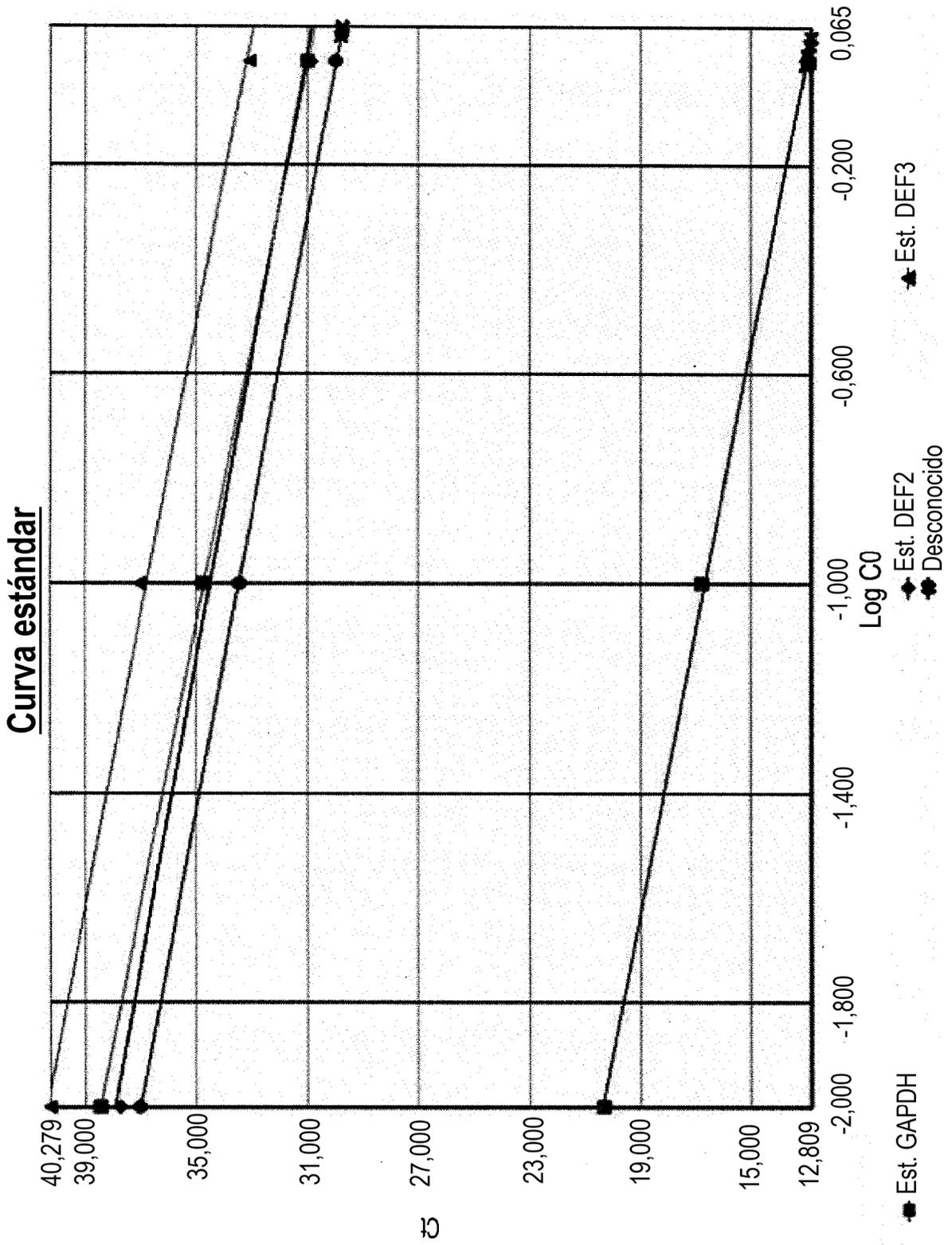
Los datos de RMN se observaron a 600 (1H) MHz en MeOH-d₄ (δ en ppm, *J* en Hz).

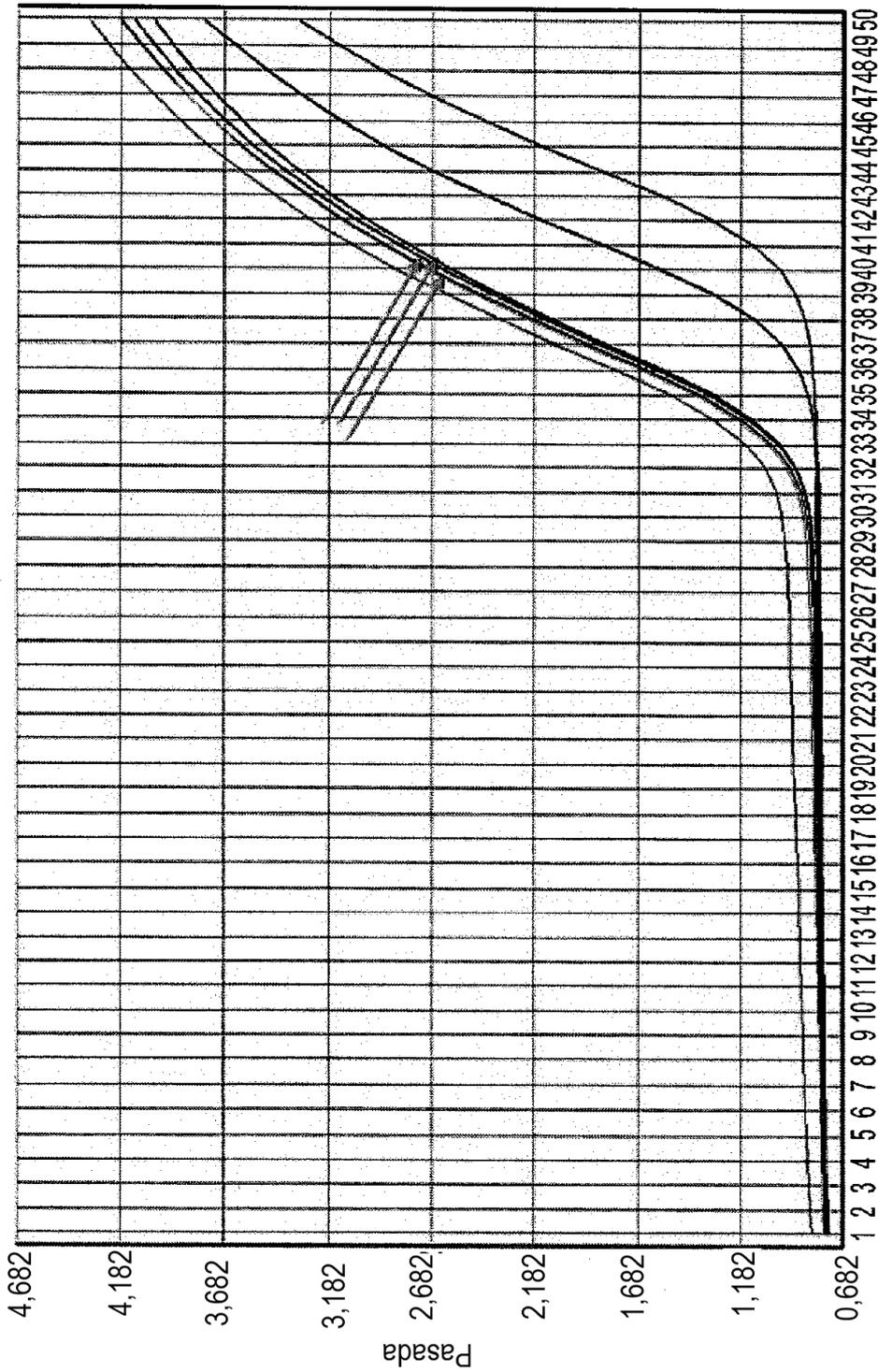
Los datos de RMN ¹³C se dedujeron mediante los experimentos de RMN 2D incluidos HSQC y HMBC.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de extracto vegetal acuoso de *Sanguisorbae officinalis* y un extracto vegetal acuoso de *Ailanthus altissima* para uso en el tratamiento o prevención de una infección cutánea en un sujeto que lo necesita, en donde la infección cutánea es una enfermedad atópica, una dermatitis de contacto, una dermatitis numular, una dermatitis por radiación, una quemadura, un eccema no atópico o una escara de decúbito.
2. Una composición para uso según la reivindicación 1, en donde la infección es secundaria con respecto a una inflamación crónica o a dermatitis atópica (DA).
3. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la composición es para reducir la secreción de una citocina tipo Th2 seleccionada de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13 en una célula de dicho sujeto.
4. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicha composición es para aumentar la expresión de una beta-defensina humana en una célula de dicho sujeto.
5. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la composición comprende además uno o más de un extracto vegetal de *Galla rhois gallnut*, un extracto vegetal de *Glycyrrhiza glabra*, un extracto vegetal de *Rheum palmatum*, un extracto vegetal de *Scutellaria baicalensis*, un extracto vegetal de *Peucedanum praeruptorum*, un extracto vegetal de *Cimicifuga racemosa*, un extracto vegetal de *Silybum marianum* y glicirrizato dipotásico.
6. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de extracto vegetal acuoso de *Sanguisorbae officinalis* y Ailantona a una concentración de al menos alrededor de 0,01 % p/p para uso en el tratamiento o prevención de una infección cutánea en un sujeto que lo necesita, en donde la infección cutánea es una enfermedad atópica, una dermatitis de contacto, una dermatitis numular, una dermatitis por radiación, una quemadura, un eccema no atópico o una escara de decúbito.
7. Una composición para uso según la reivindicación 6, en donde la infección es secundaria con respecto a una inflamación crónica o a dermatitis atópica (DA).
8. La composición para uso según la reivindicación 6, en donde dicha composición comprende, además, uno o más de un extracto vegetal de *Galla rhois gallnut*, un extracto vegetal de *Glycyrrhiza Glabra*, un extracto de raíz de *Rheum palmatum*, un extracto de fruto de *Cnidium monnieri* y un extracto de raíz de *Scutellaria baicalensis*.
9. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde dicho extracto vegetal de *Sanguisorbae officinalis* y el extracto vegetal de *Ailanthus altissima* comprende un extracto vegetal acuoso purificado de forma adicional utilizando una cromatografía en resina que comprende una resina macroporosa.
10. Una forma de dosificación unitaria que comprende un extracto acuoso de cada uno de *Sanguisorbae officinalis* a una concentración de 0,5-2 % peso/peso; extracto vegetal de *Ailanthus altissima* a una concentración de 0,5-2 % p/p o Ailantona a una concentración de al menos 0,01 % p/p; y extracto de raíz de *Scutellaria baicalensis* o extracto de raíz de *Rheum palmatum* raíz o una combinación de estos a una concentración de 0,5-2 % p/p.

FIG. 1





Número de ciclo
FIG. 2

FIG. 3A

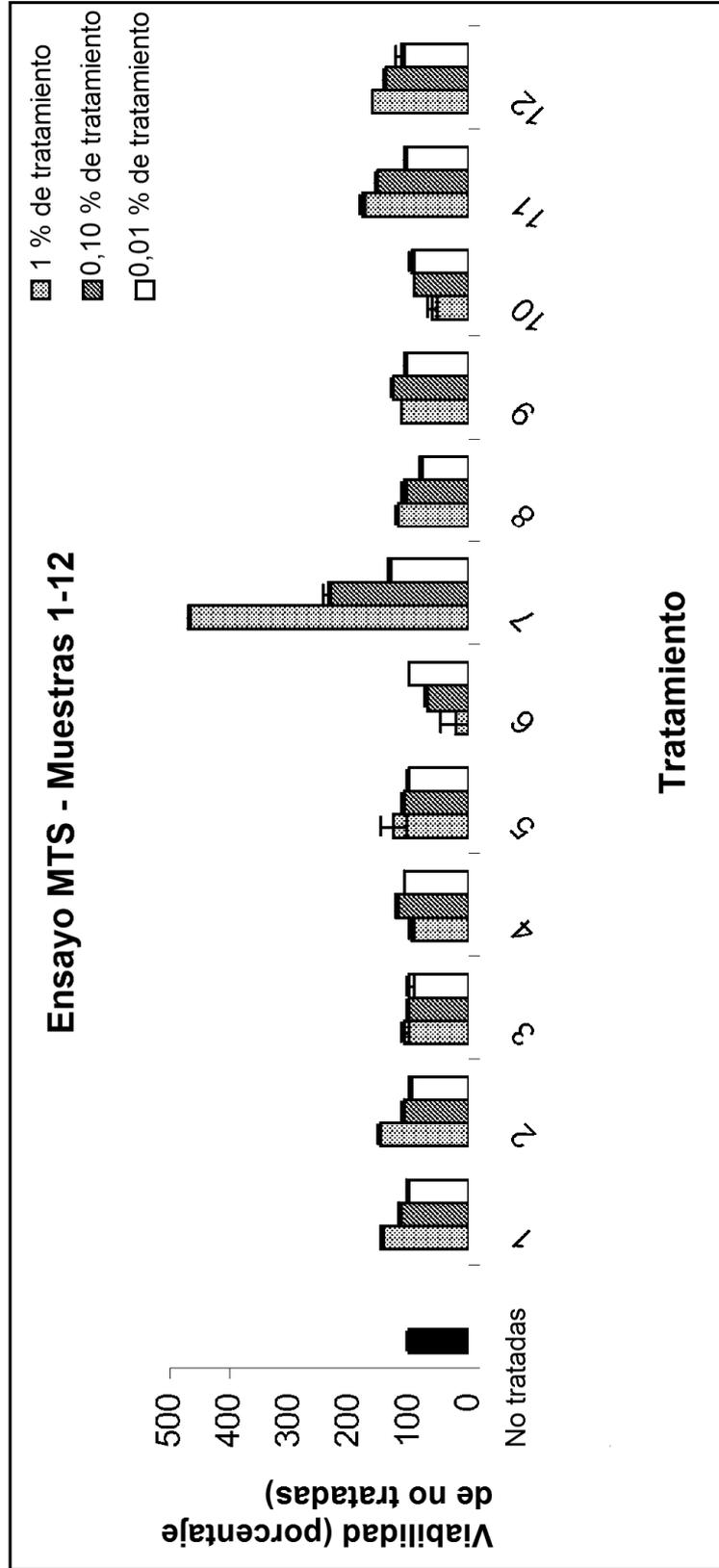


FIG. 3B

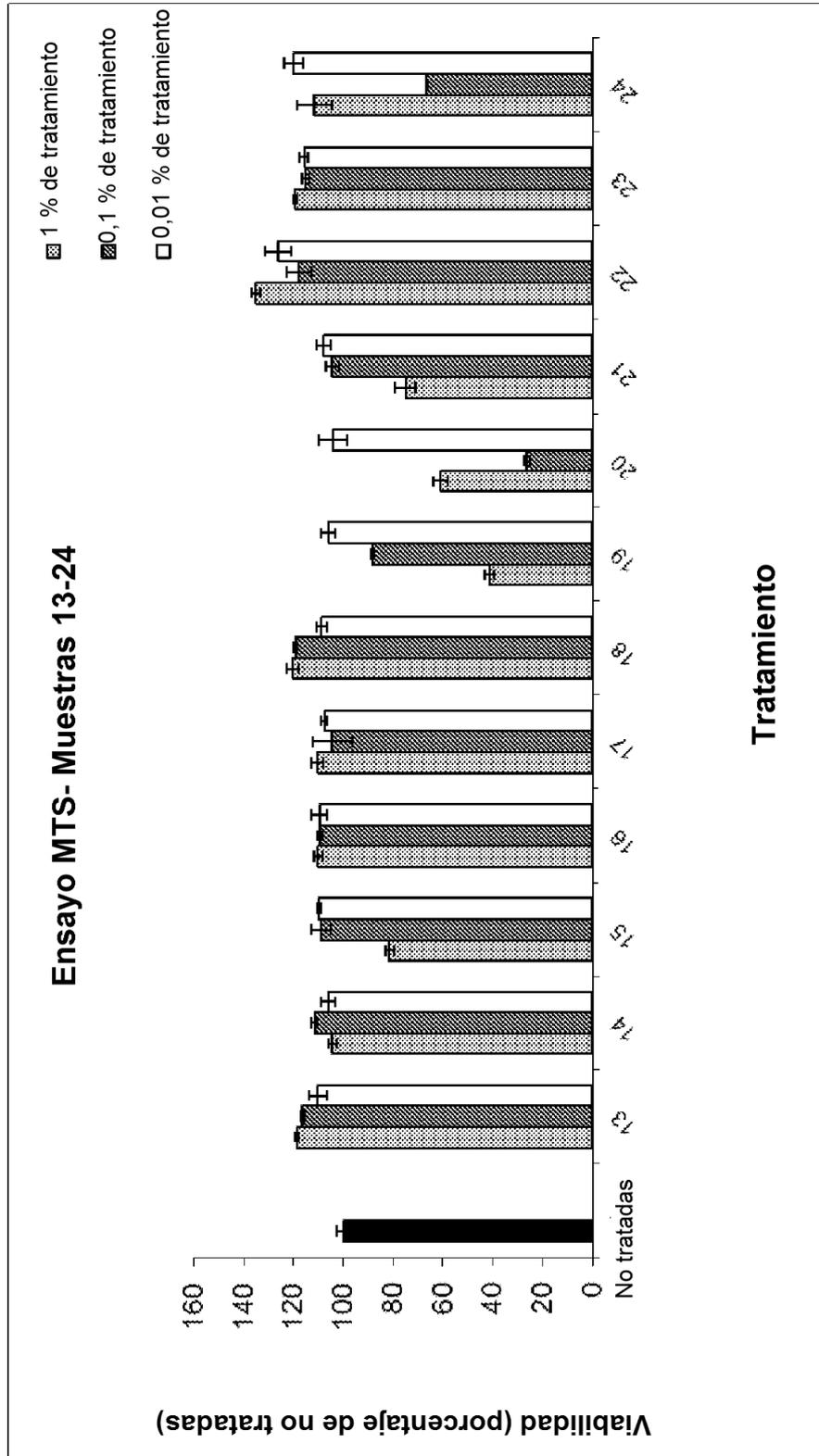


FIG. 3C

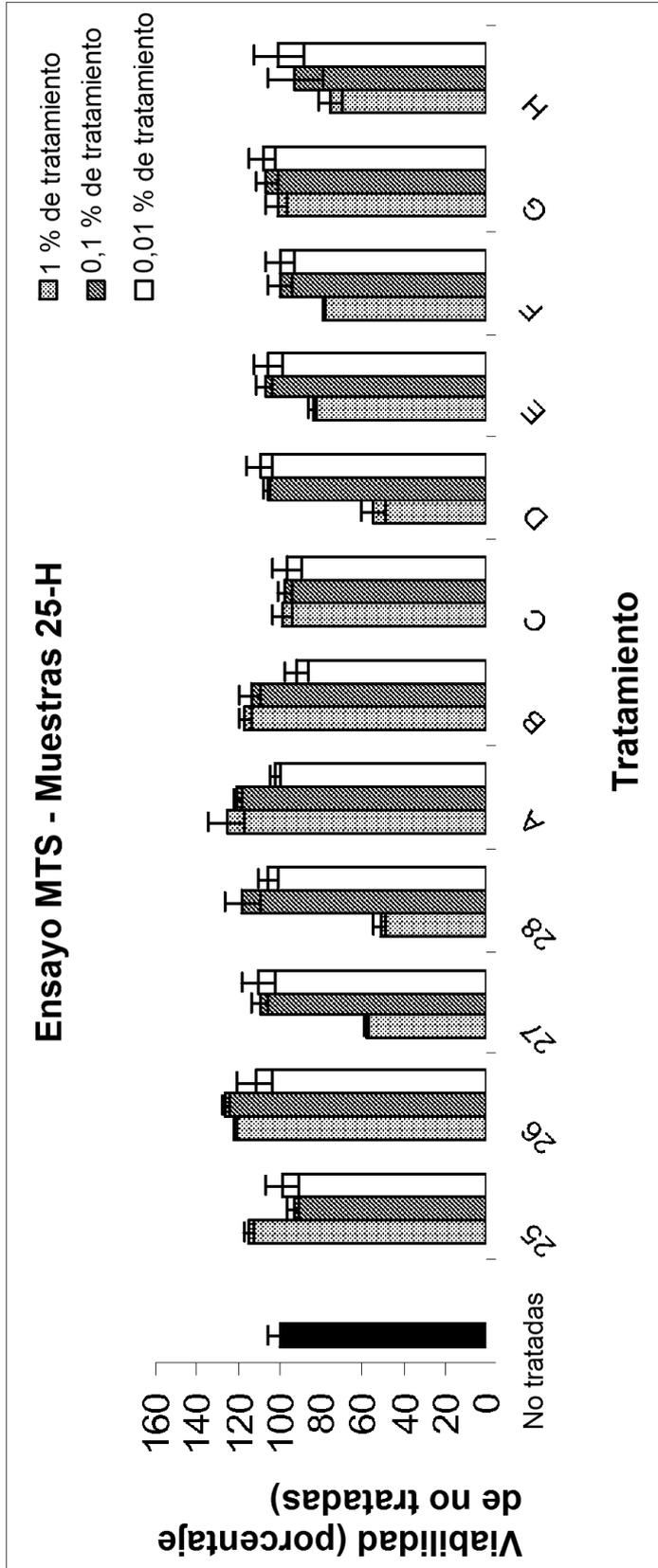
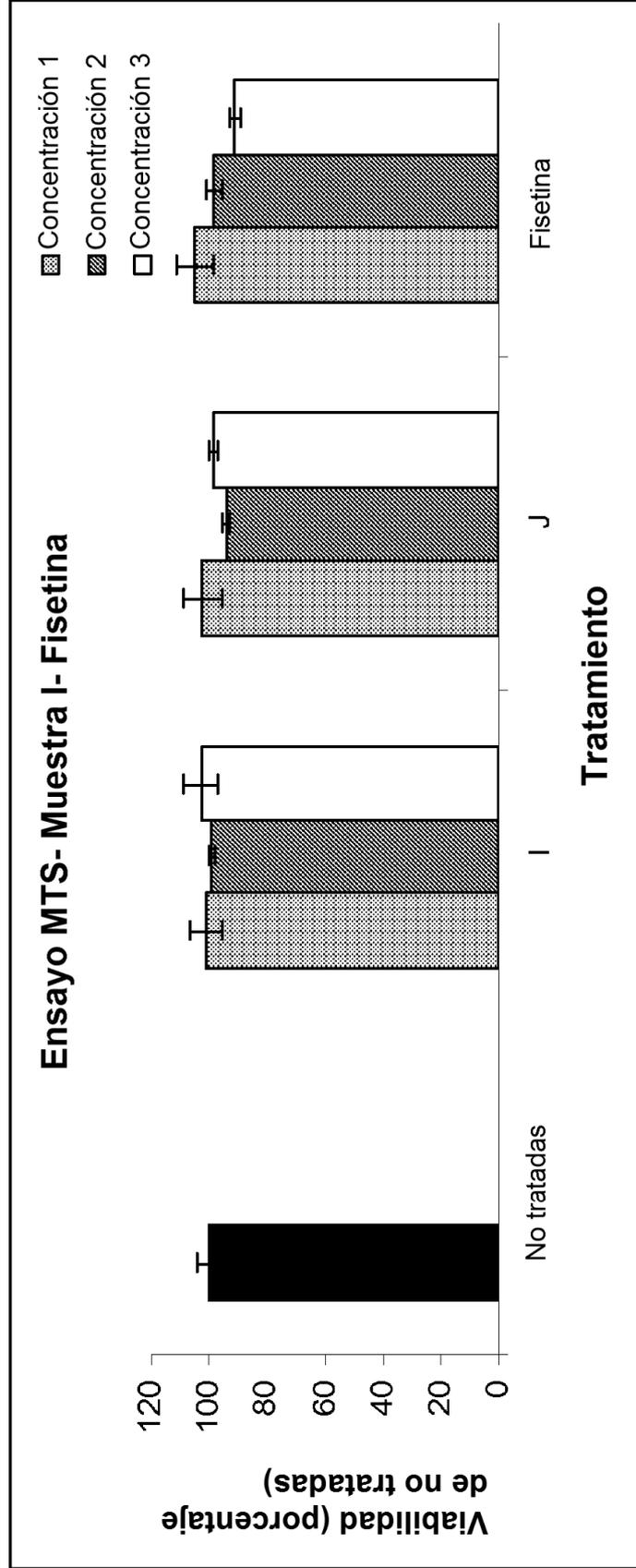


FIG. 3D



Concentración 1- 1%(Fisetina-100 μM); Concentración 2-0,1 % (Fisetina- 10 μM)
 Concentración 3- 0,01 % (Fisetina- 1 μM)

FIG. 4A

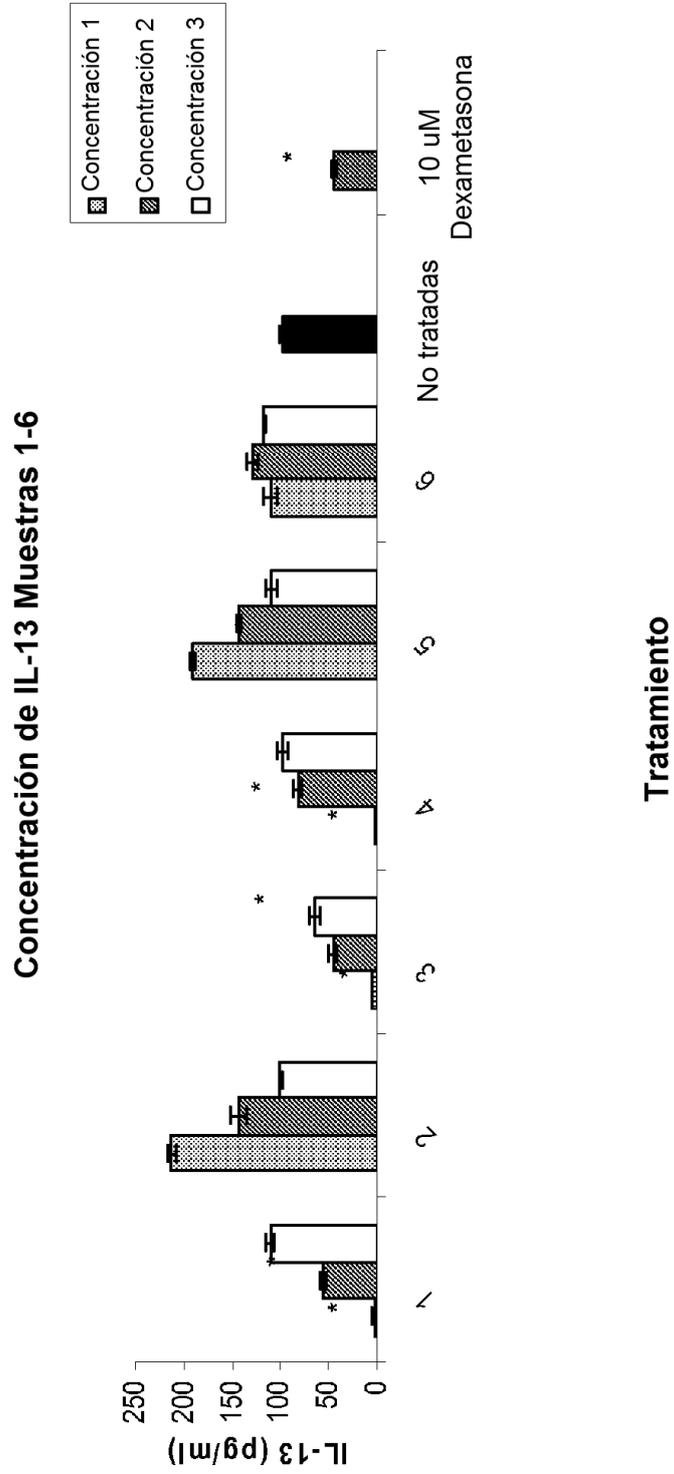
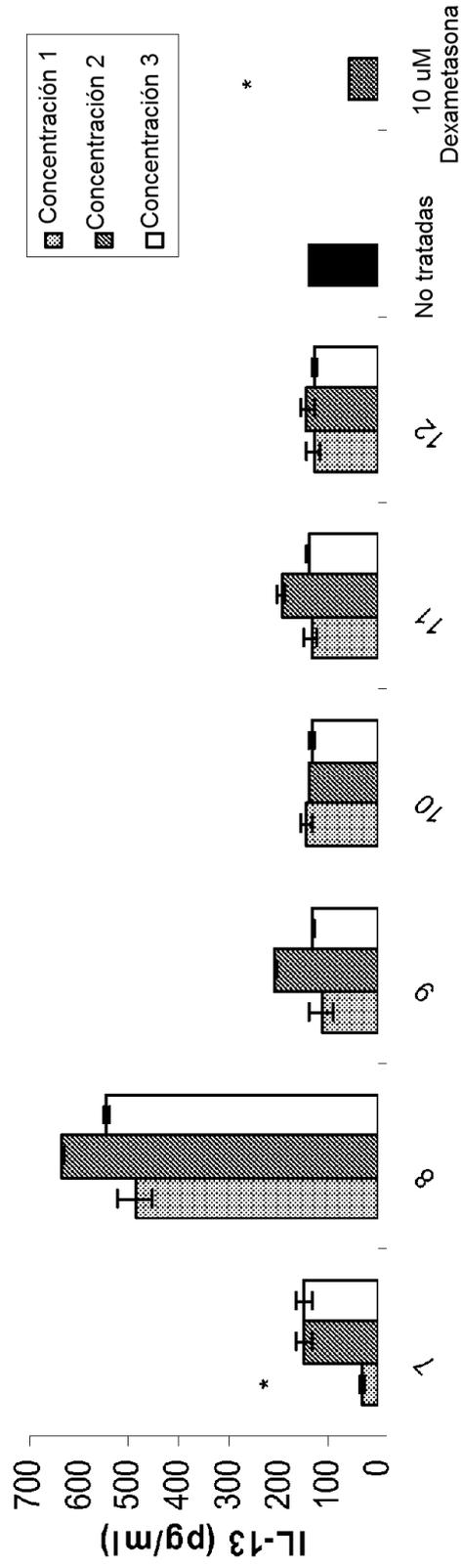


FIG. 4B

Concentración de IL-13 Muestras 7-12



Tratamiento

FIG. 4C

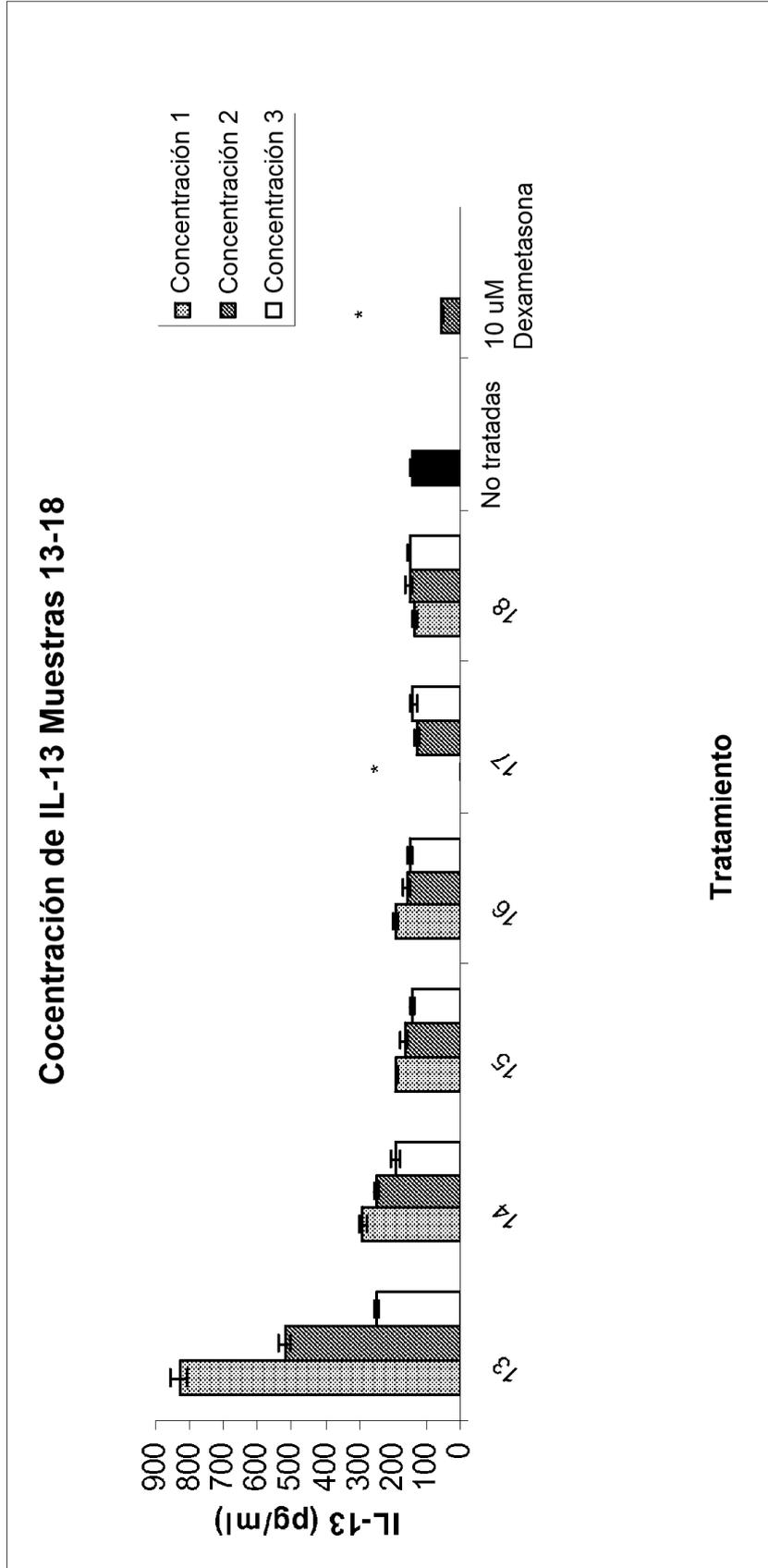


FIG. 4D

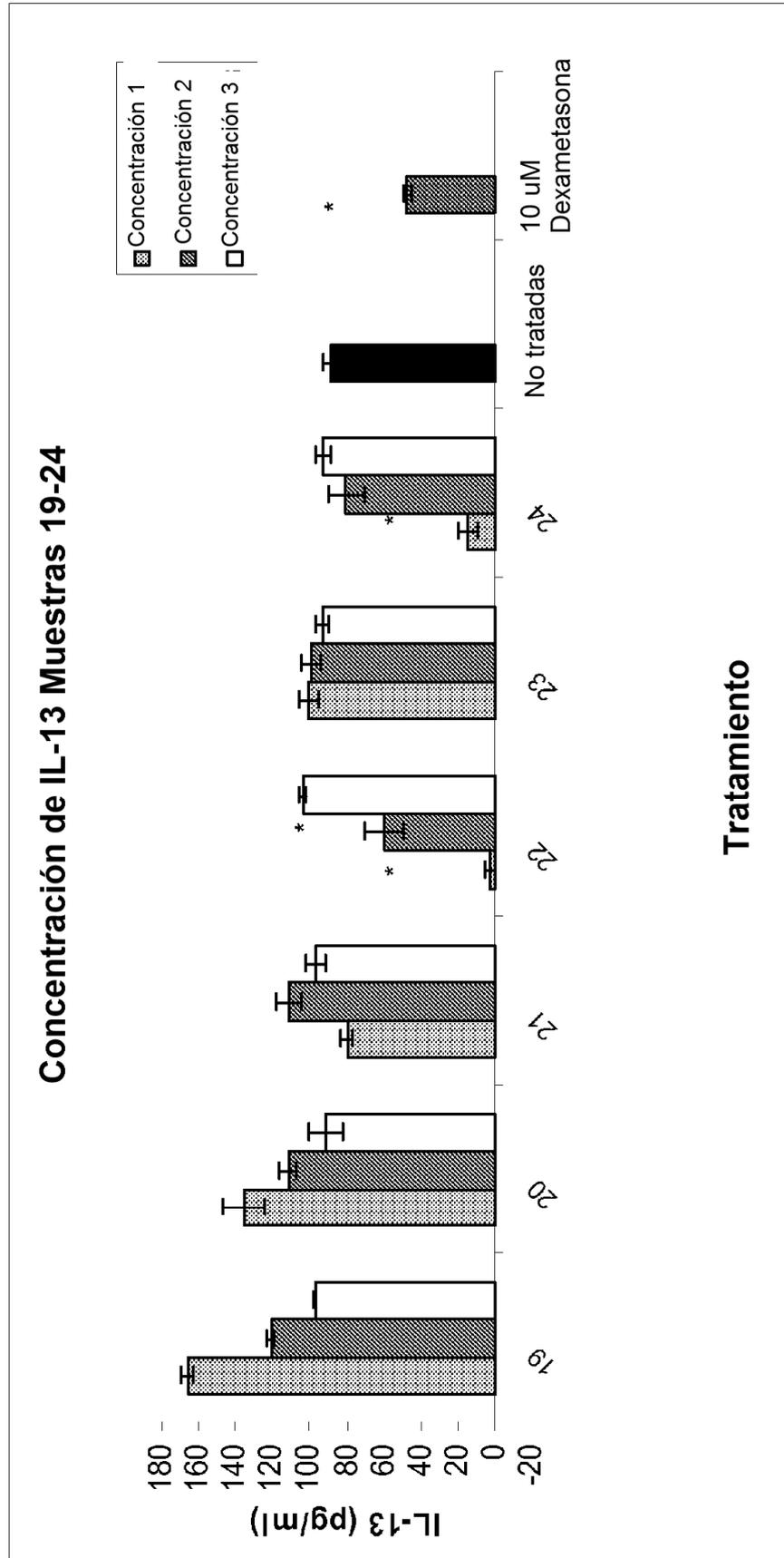


FIG. 4E

Concentración de IL-13 Muestras 25-B

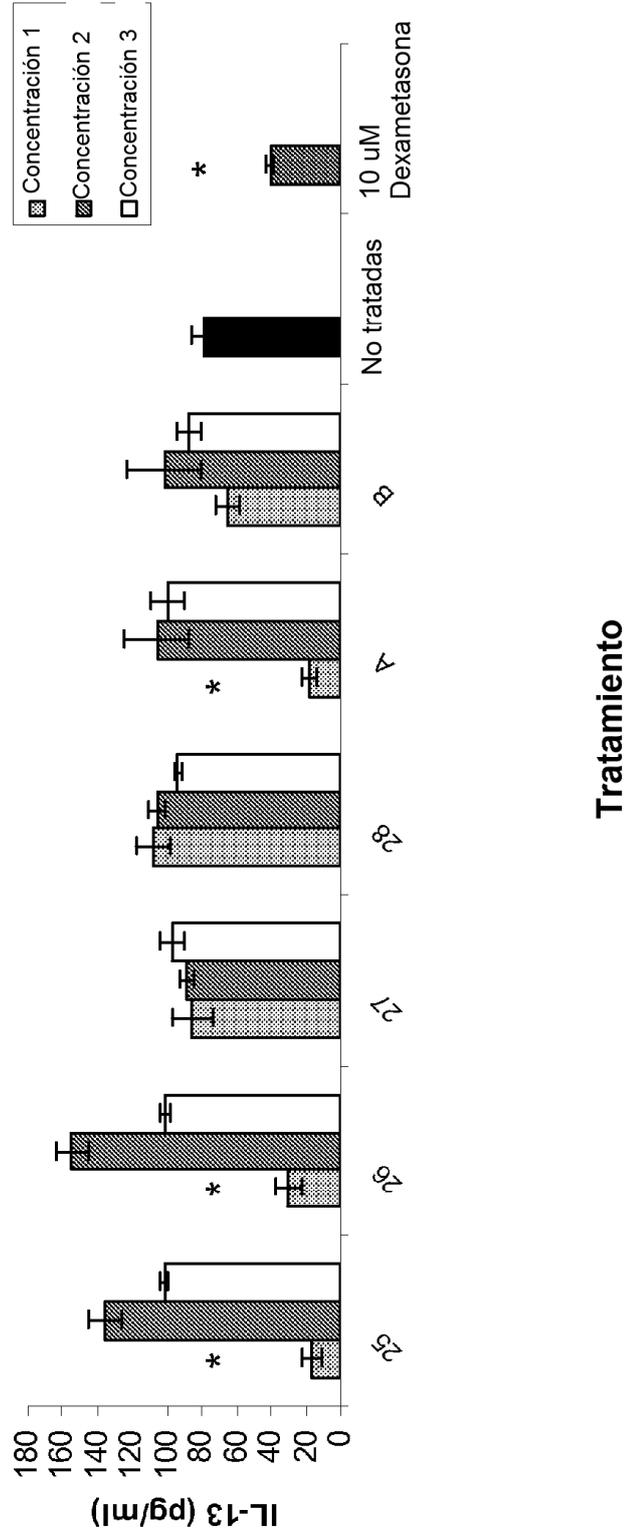
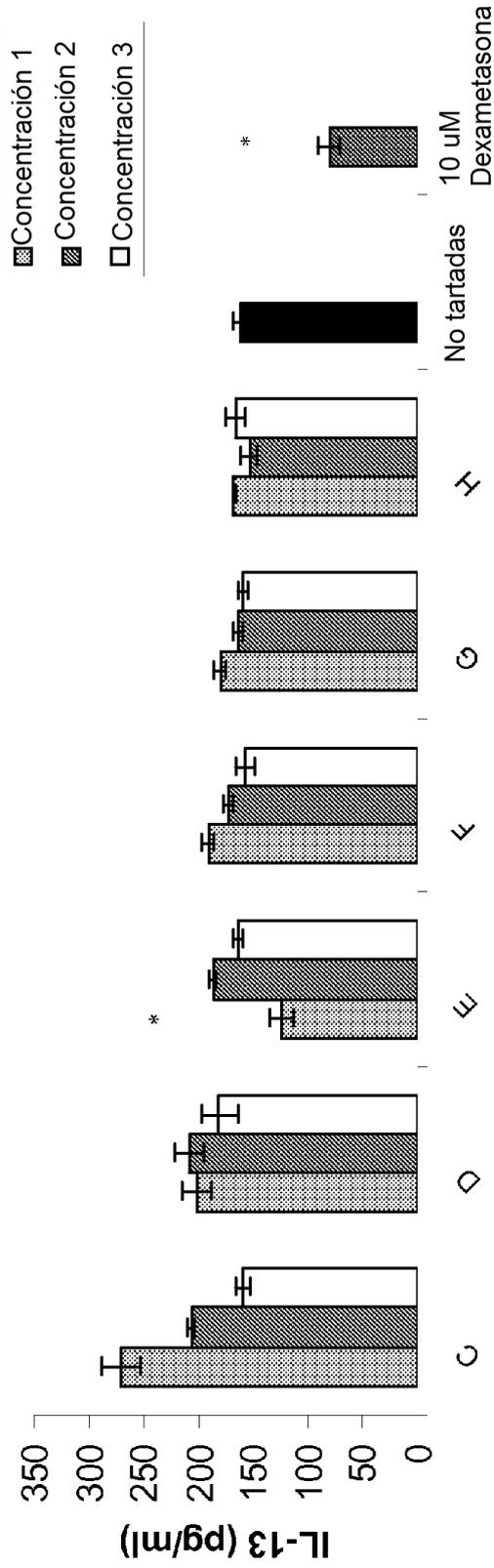


FIG. 4F

Concentración de IL-13 Muestras C-H



Tratamiento

FIG. 4G

Concentración de IL-13 Muestras I-Fisetina

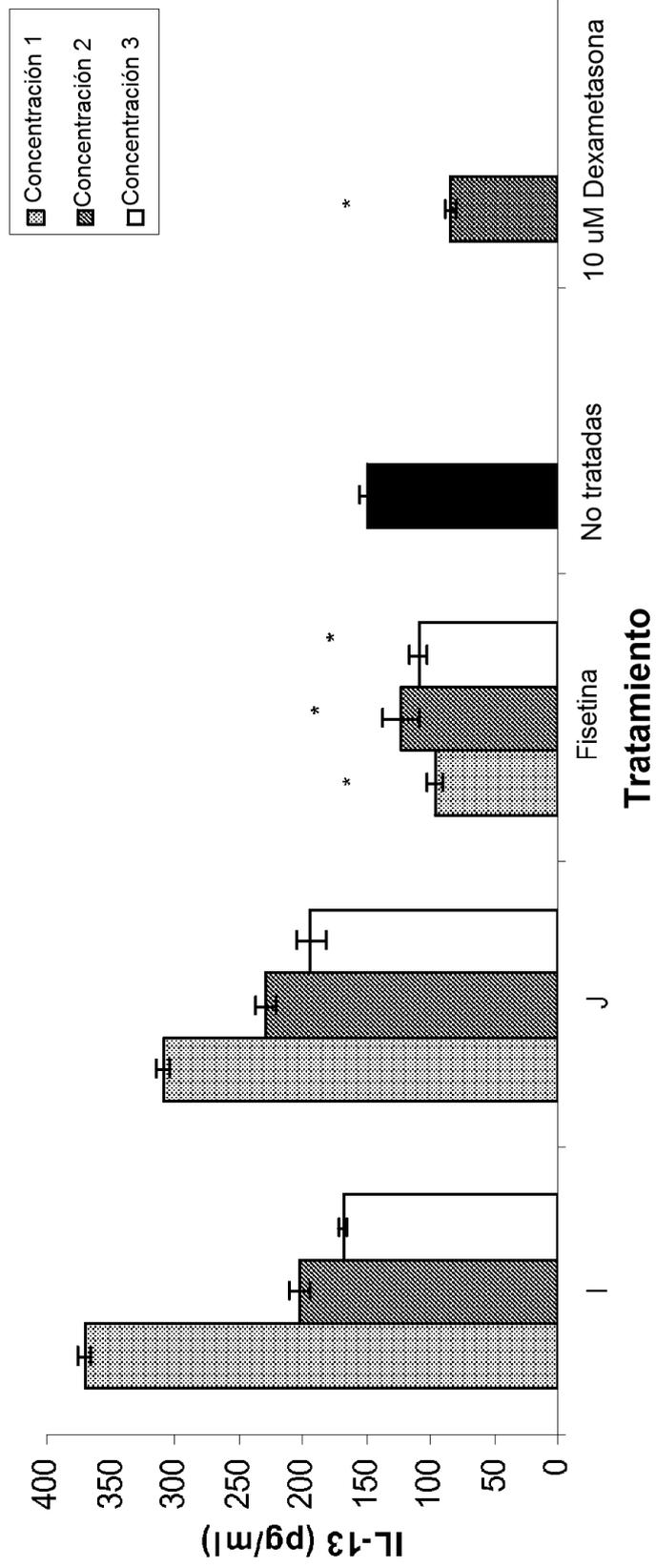


FIG. 5

Pasada con respecto a Ciclo

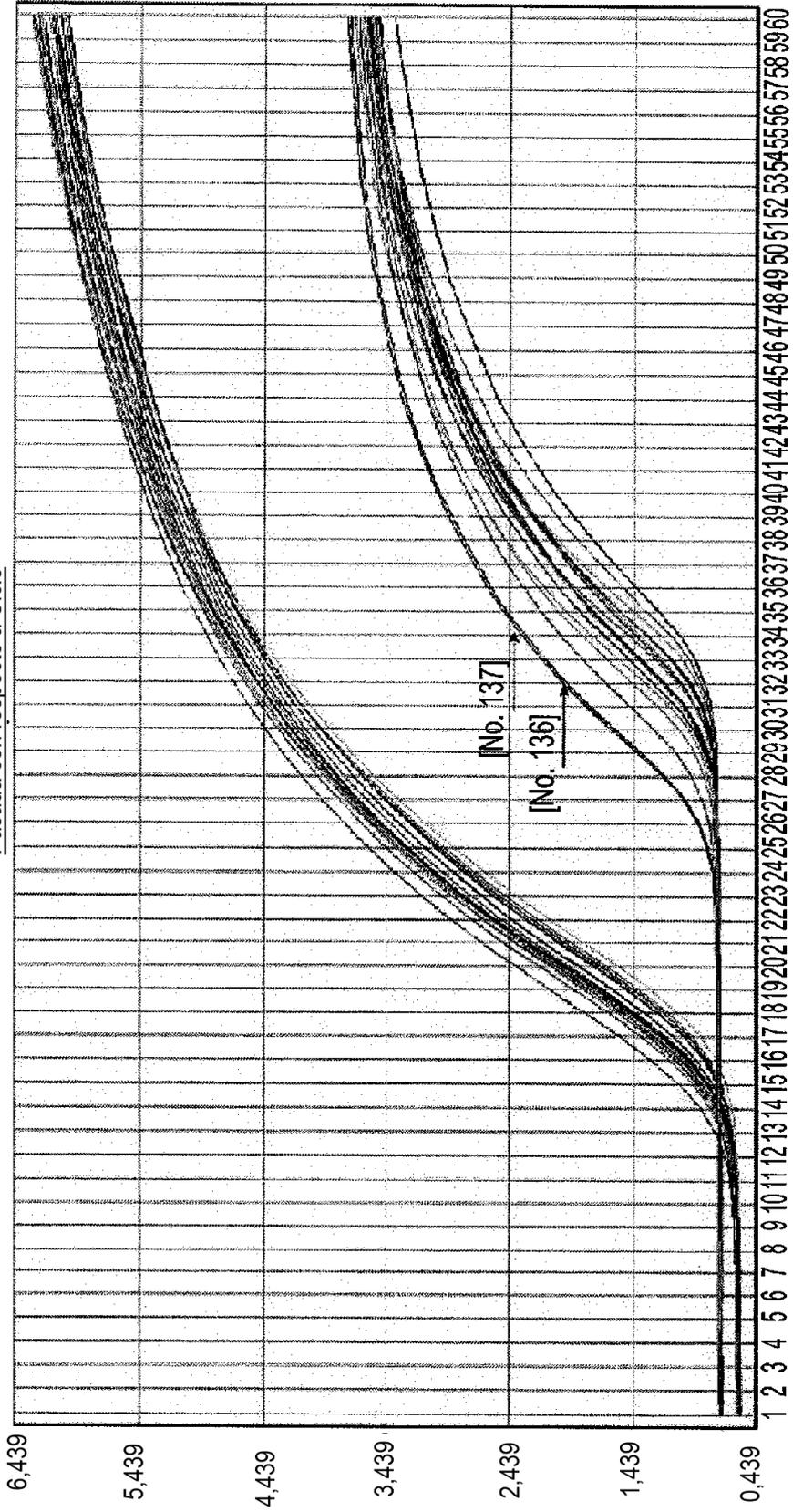


FIG. 6

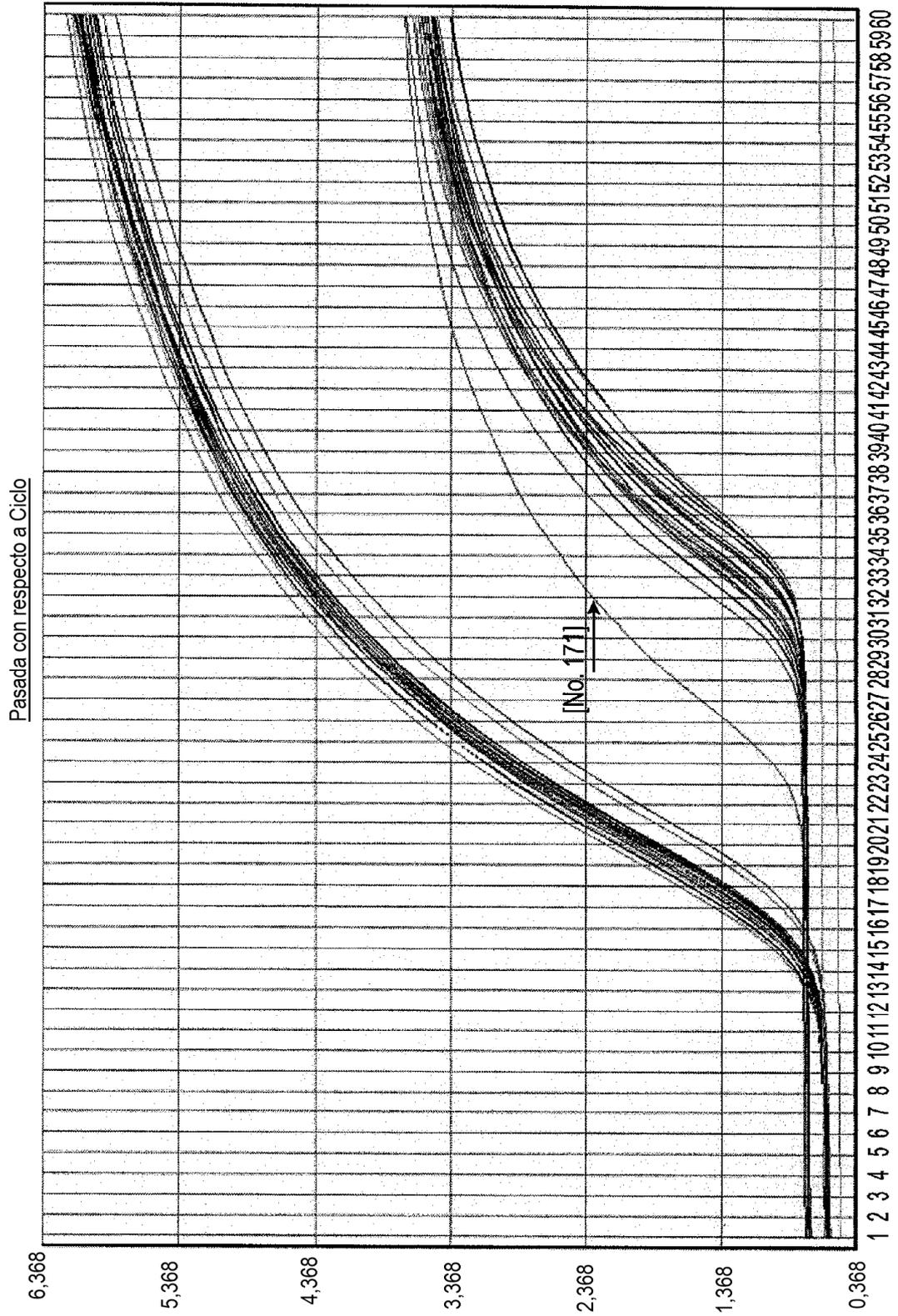


FIG. 7

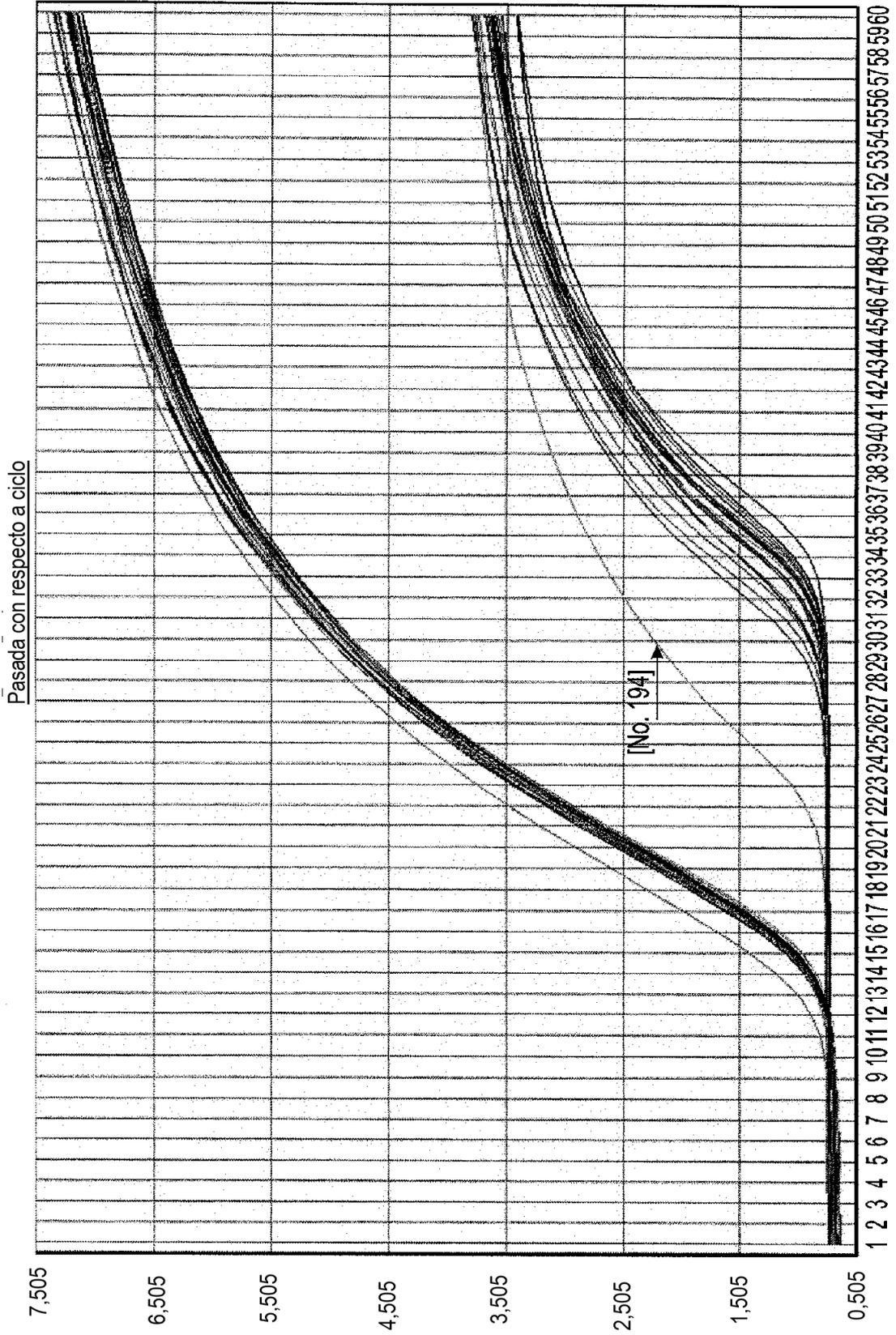


FIG. 8

Pasada con respecto a ciclo

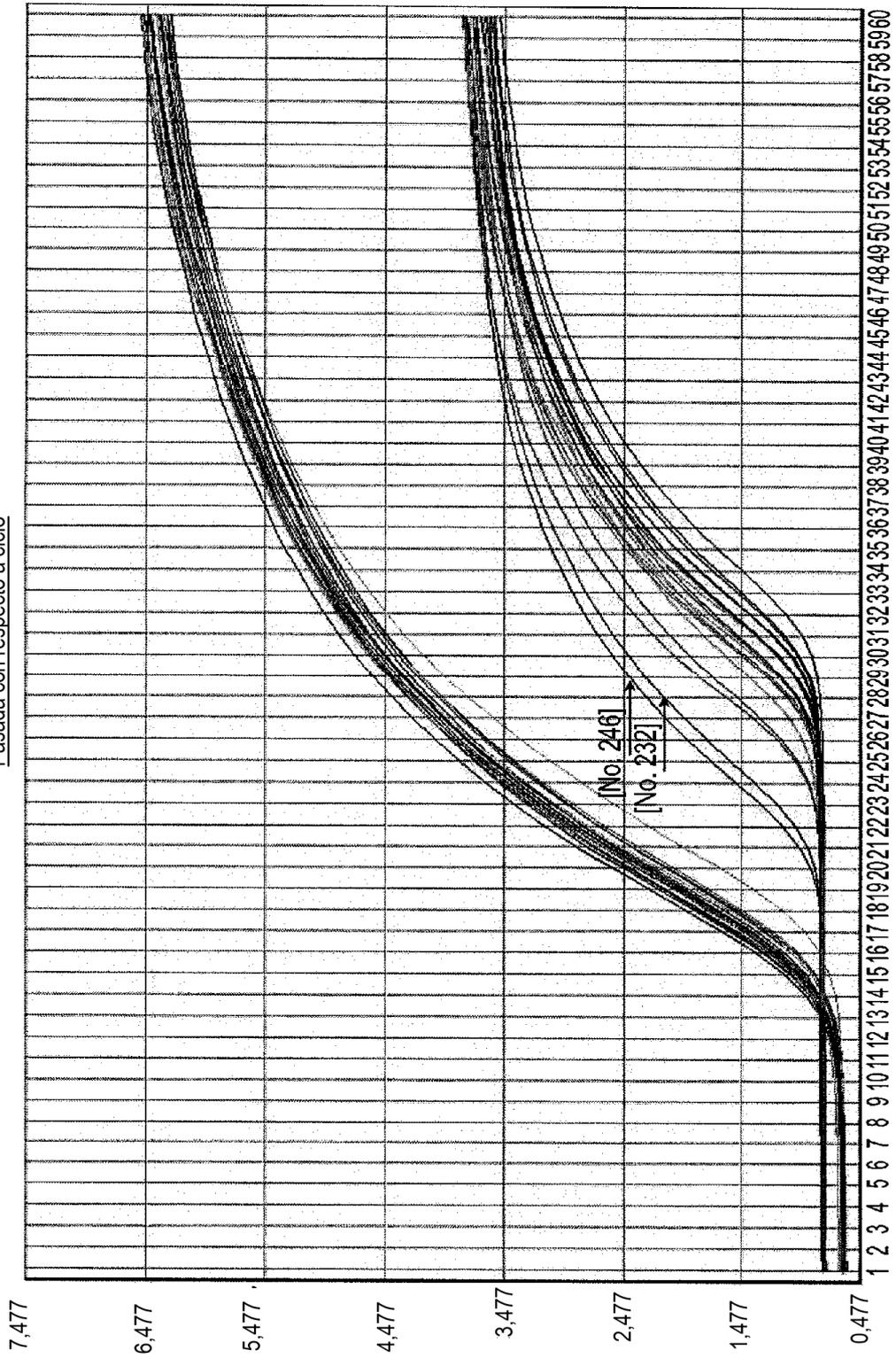


FIG. 9

Pasada con respecto a ciclo

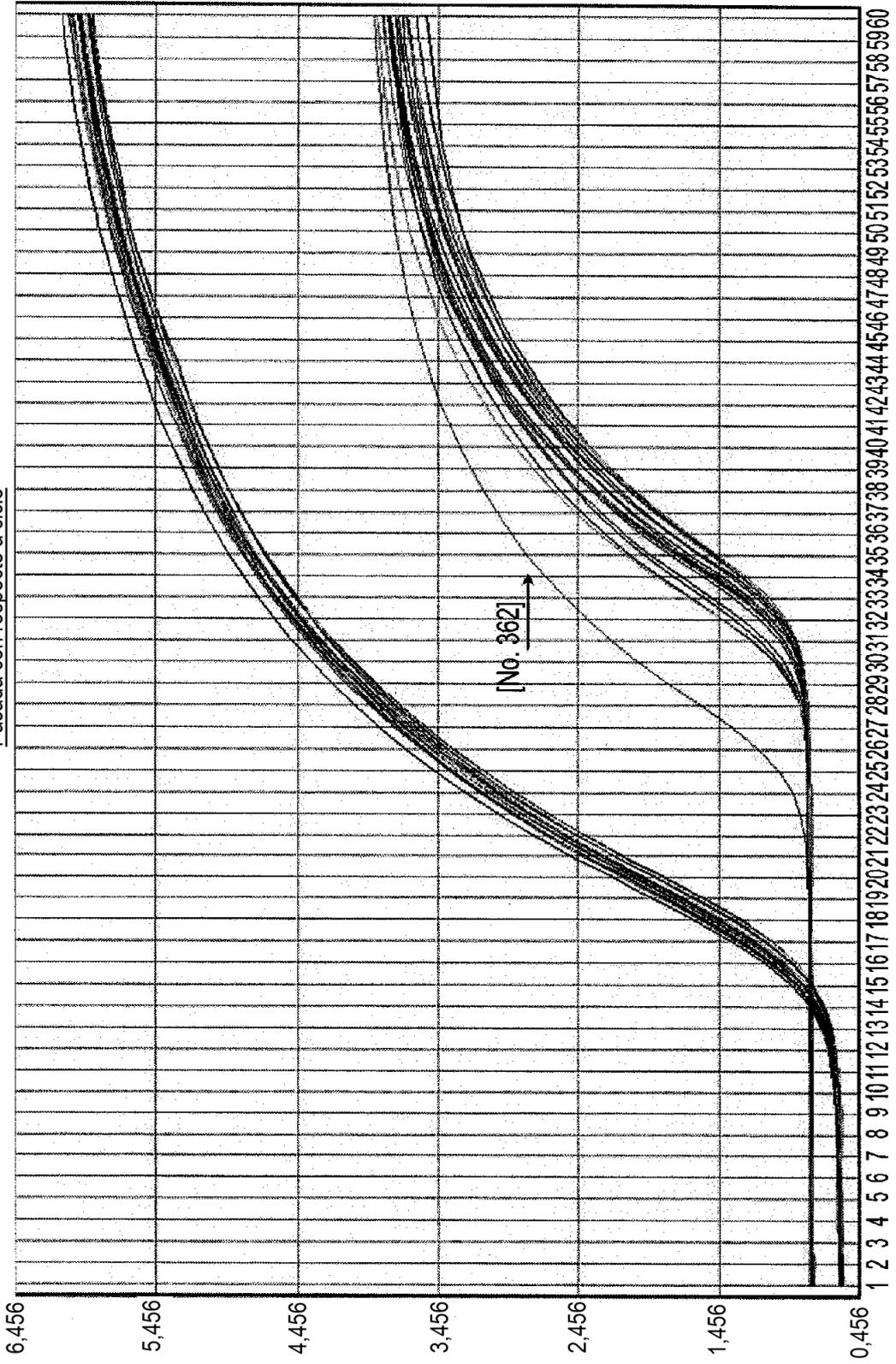


FIG. 10

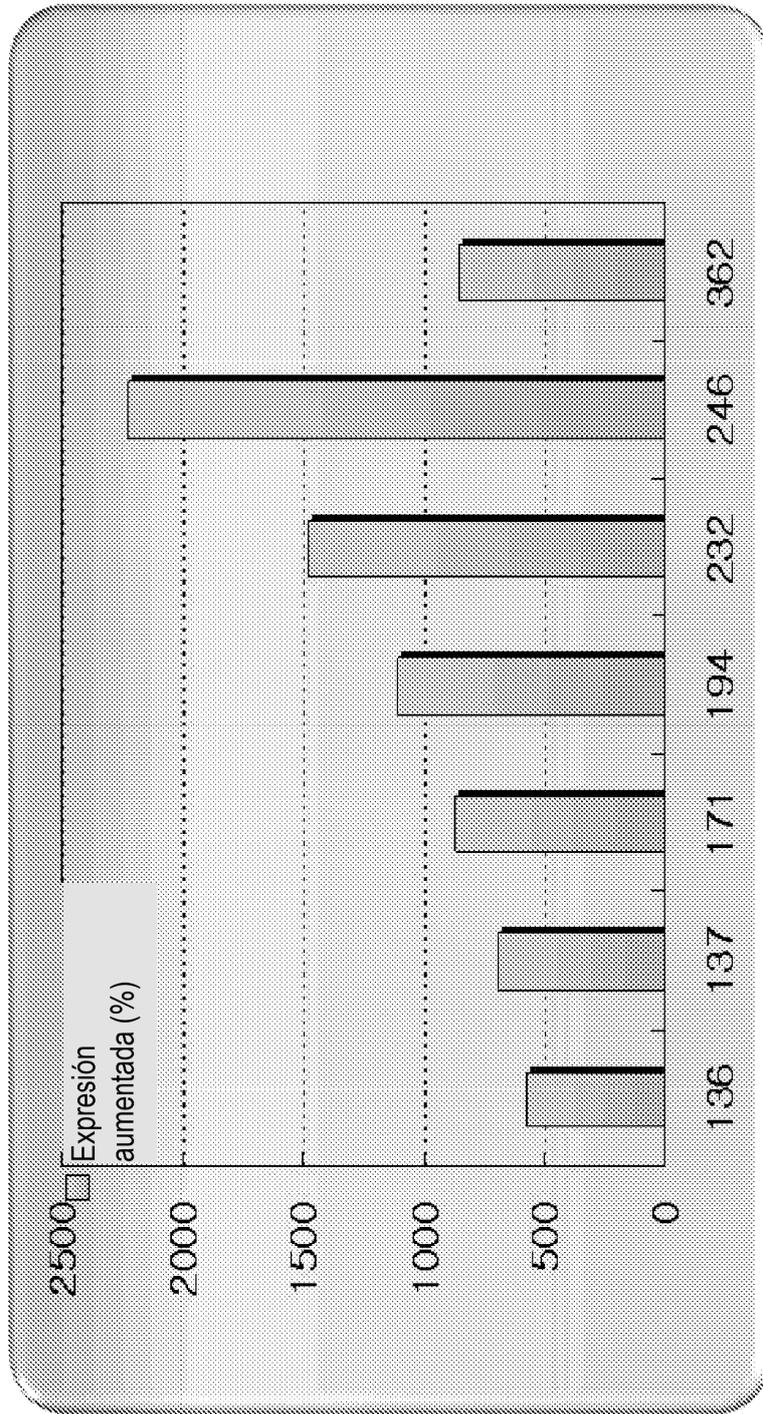


FIG. 11

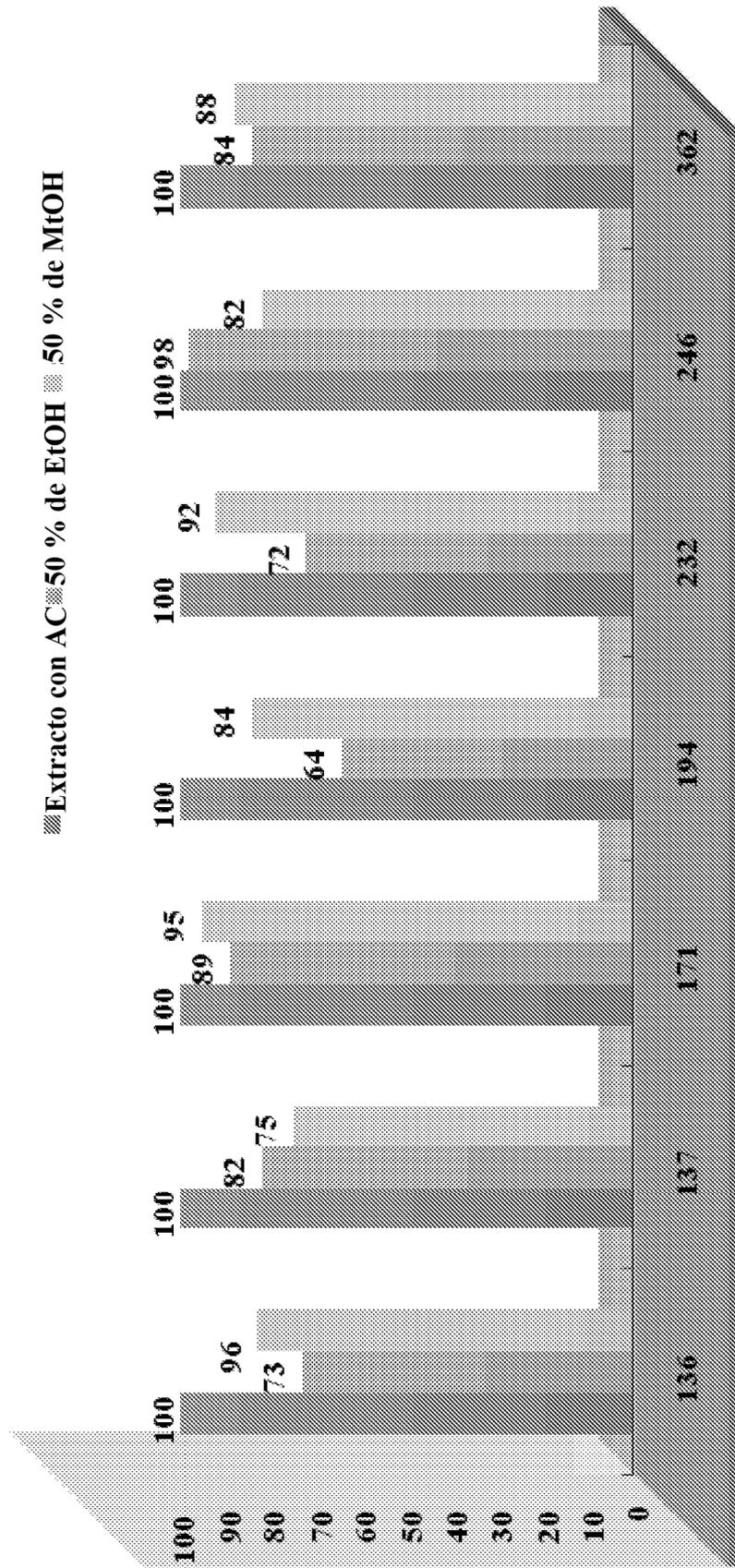


FIG. 12

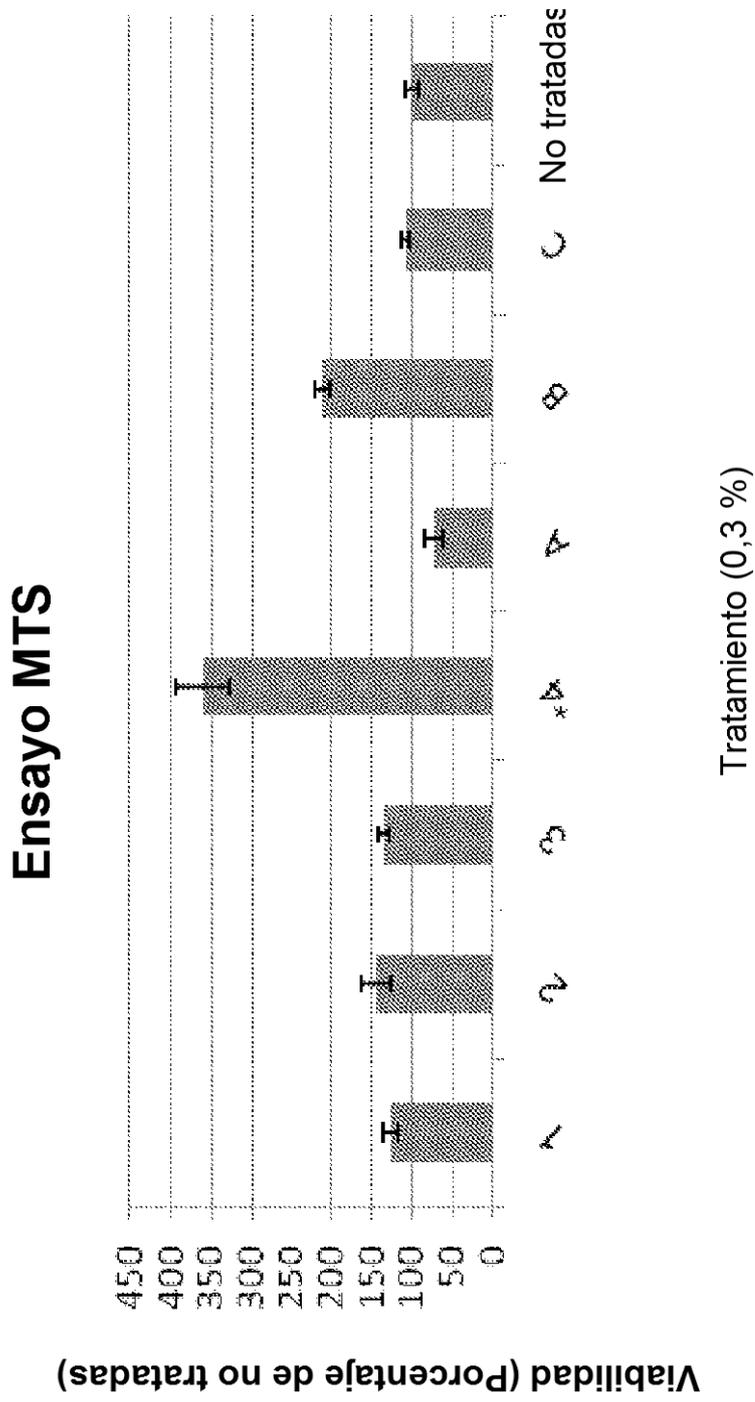
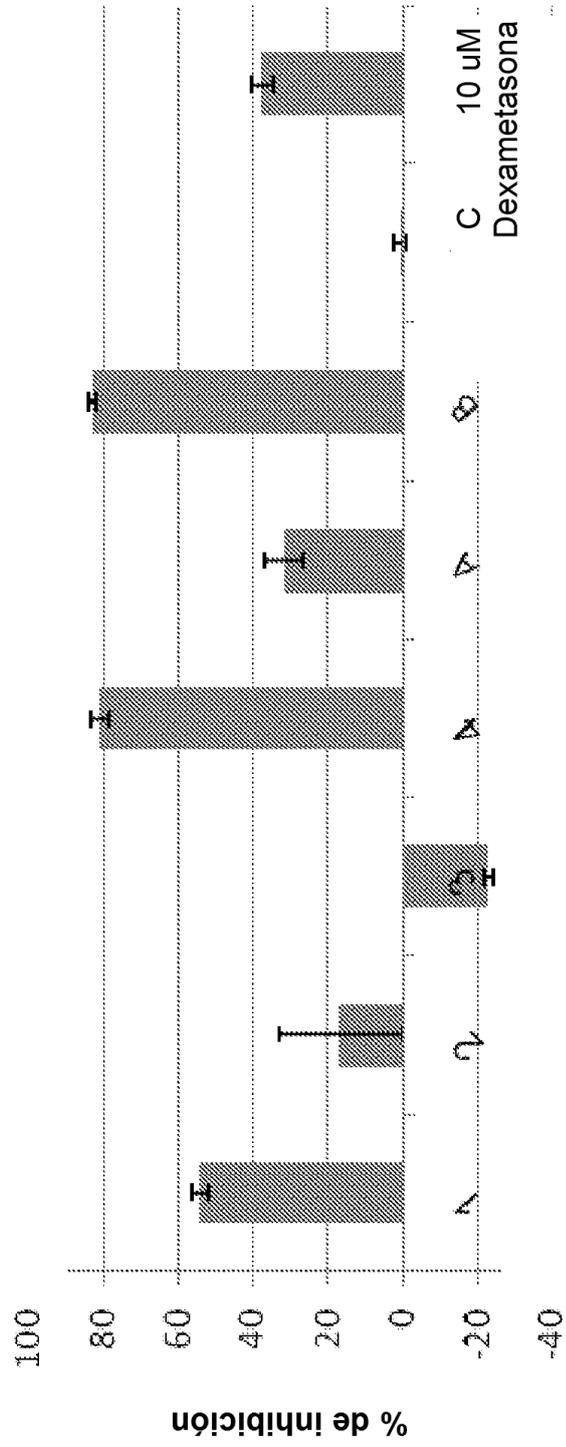


FIG. 13

Inhibición de IL-13



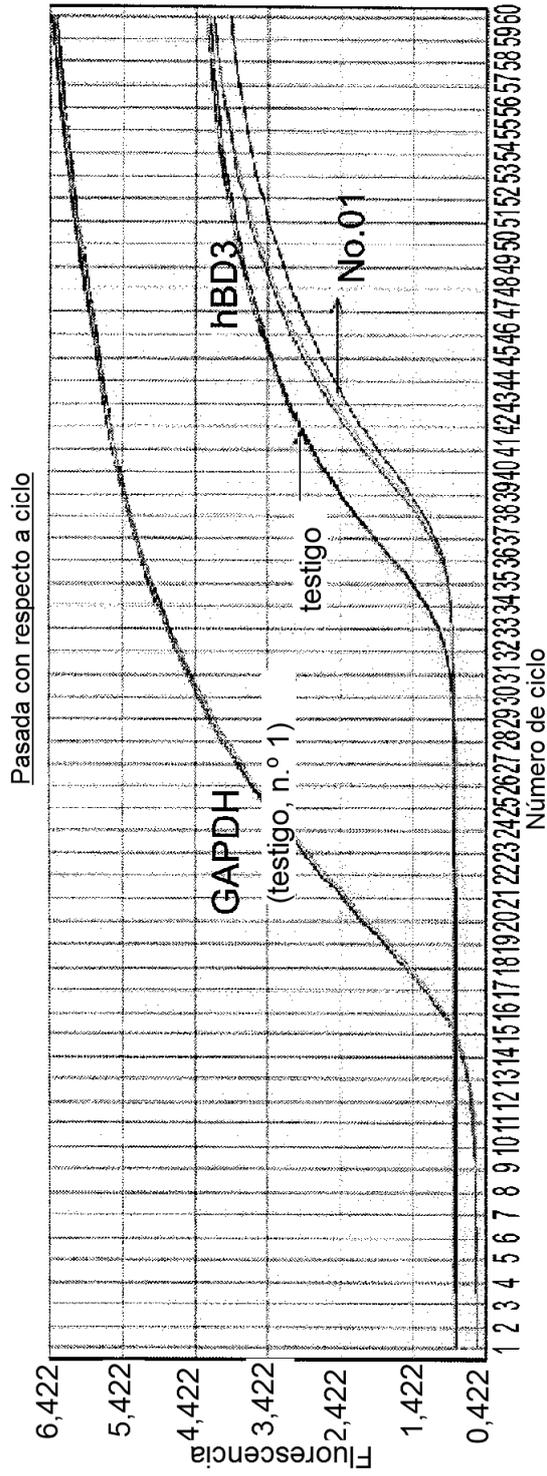


FIG. 14A

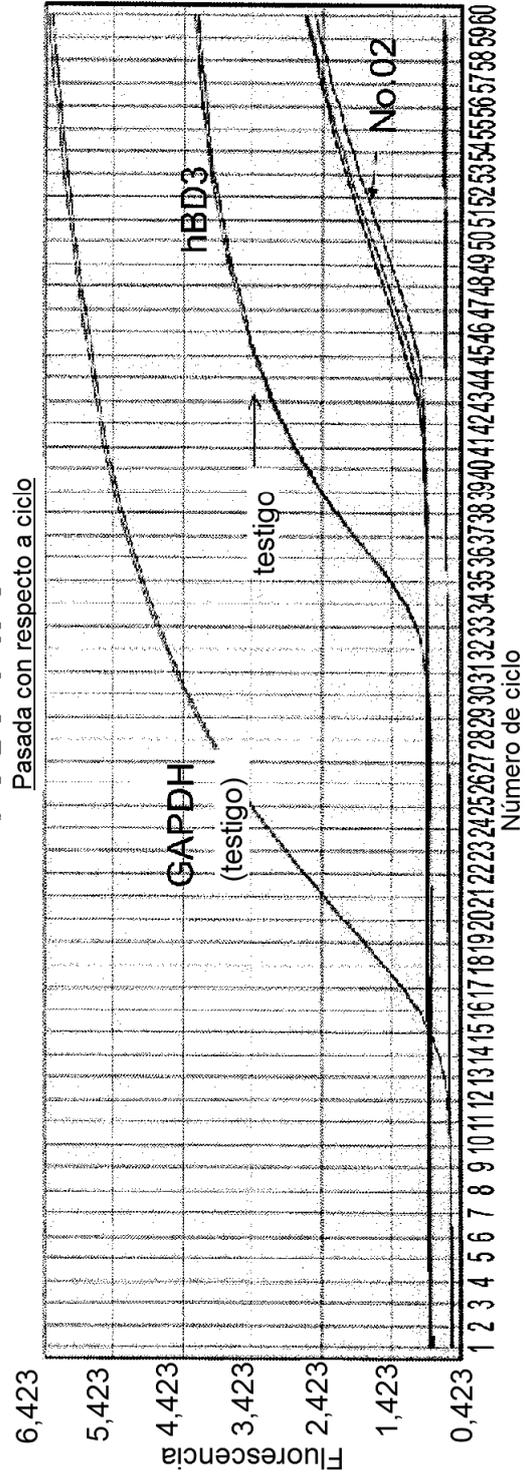


FIG. 14B

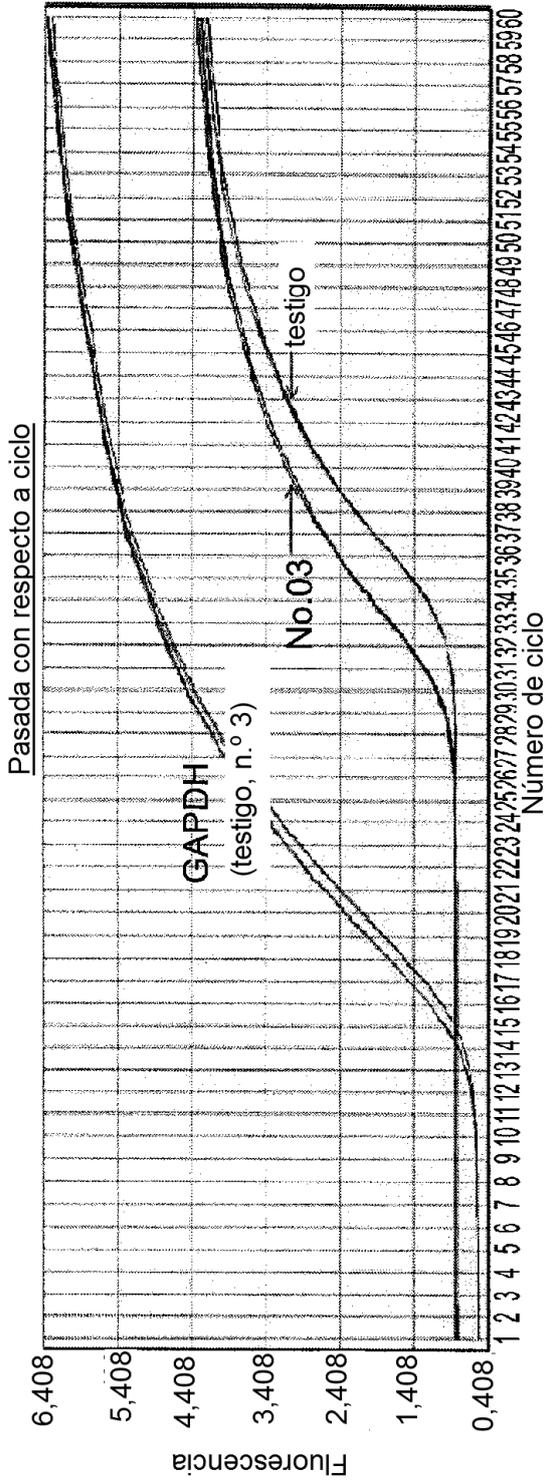


FIG. 14C

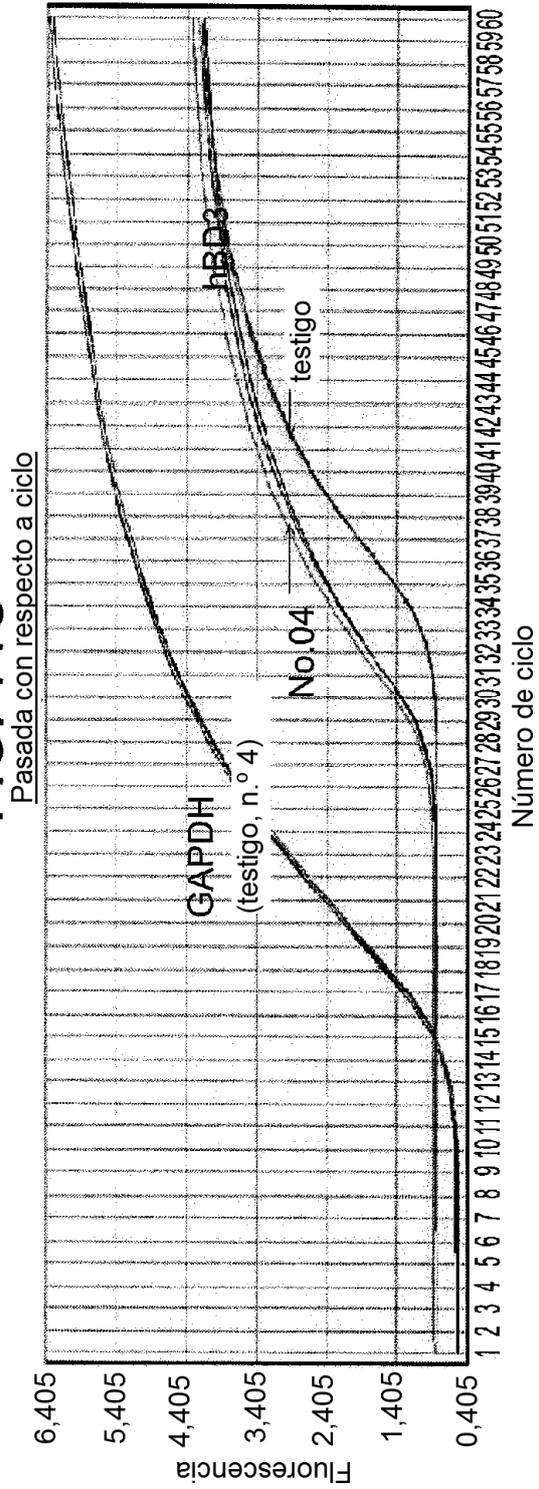
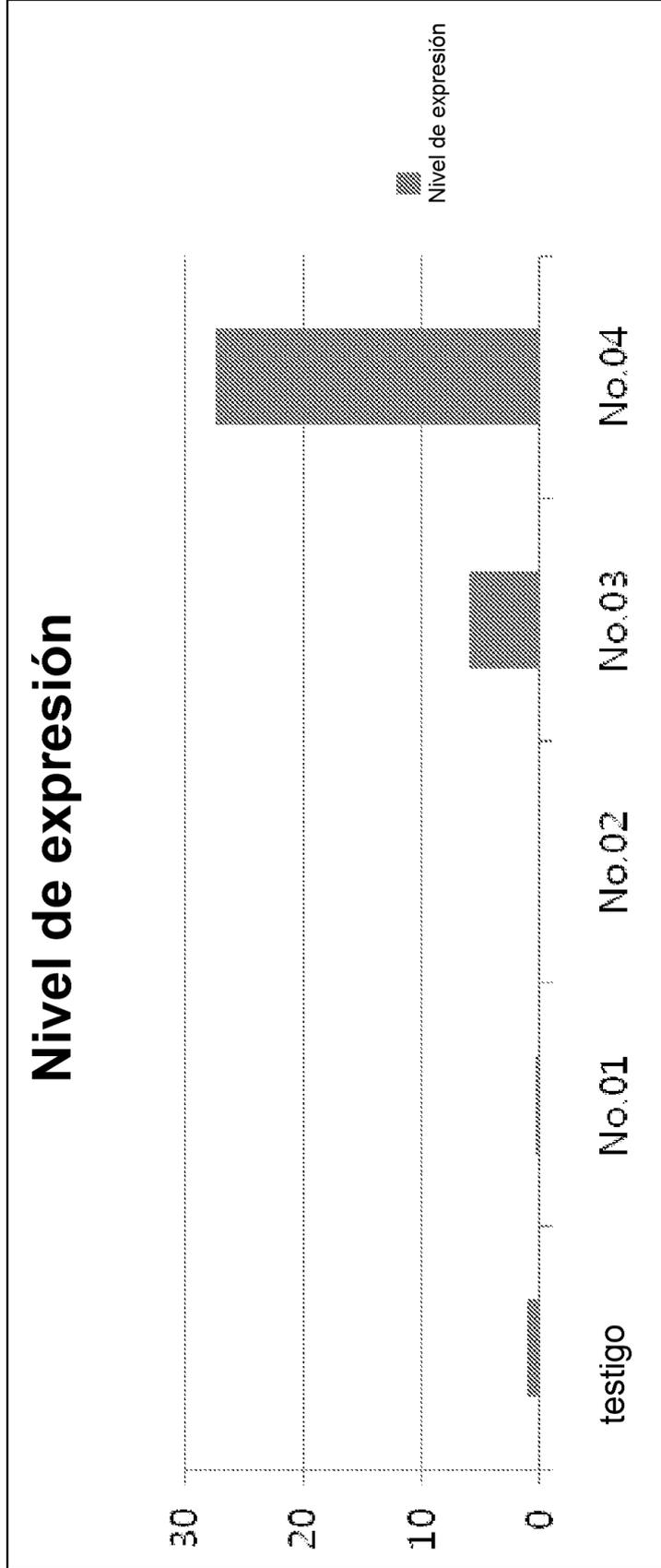


FIG. 14D

FIG. 14E



Nivel de expresión

FIG. 15A

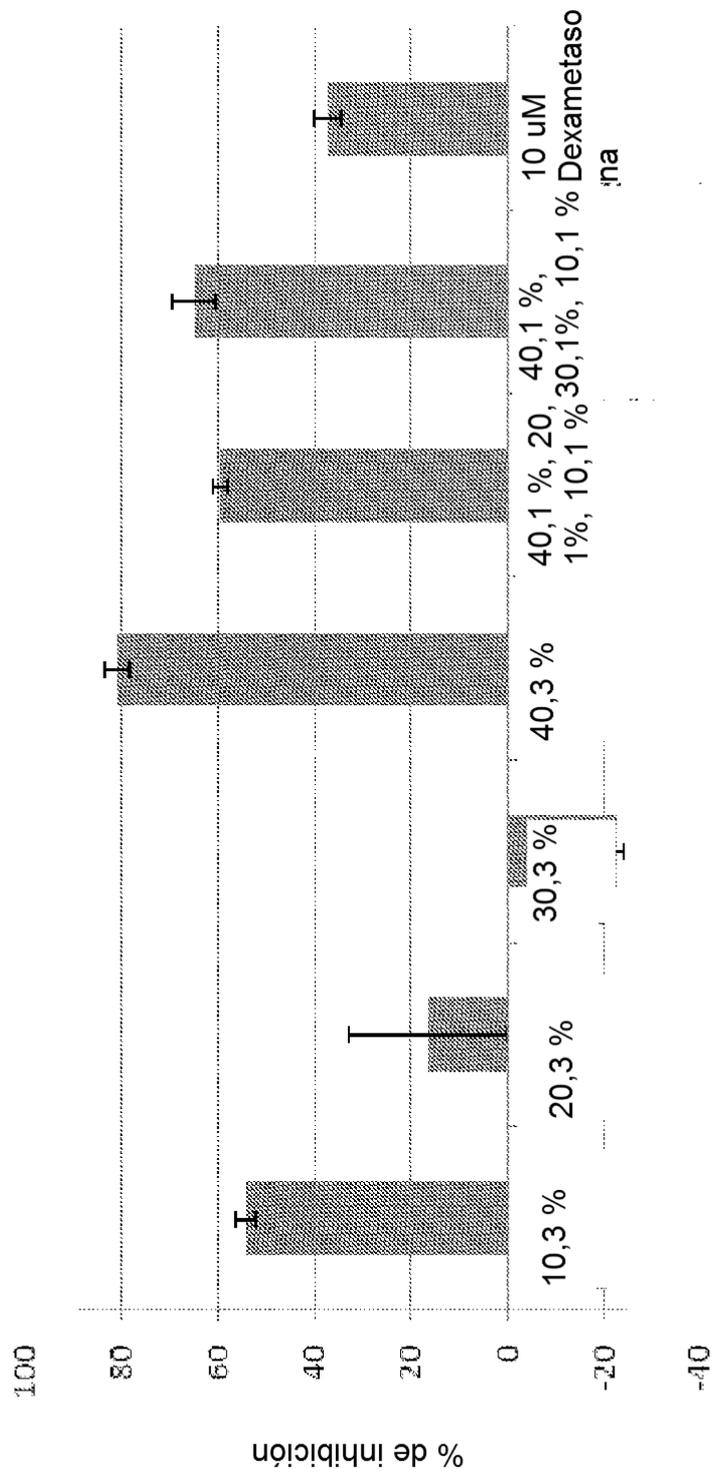


FIG. 15B

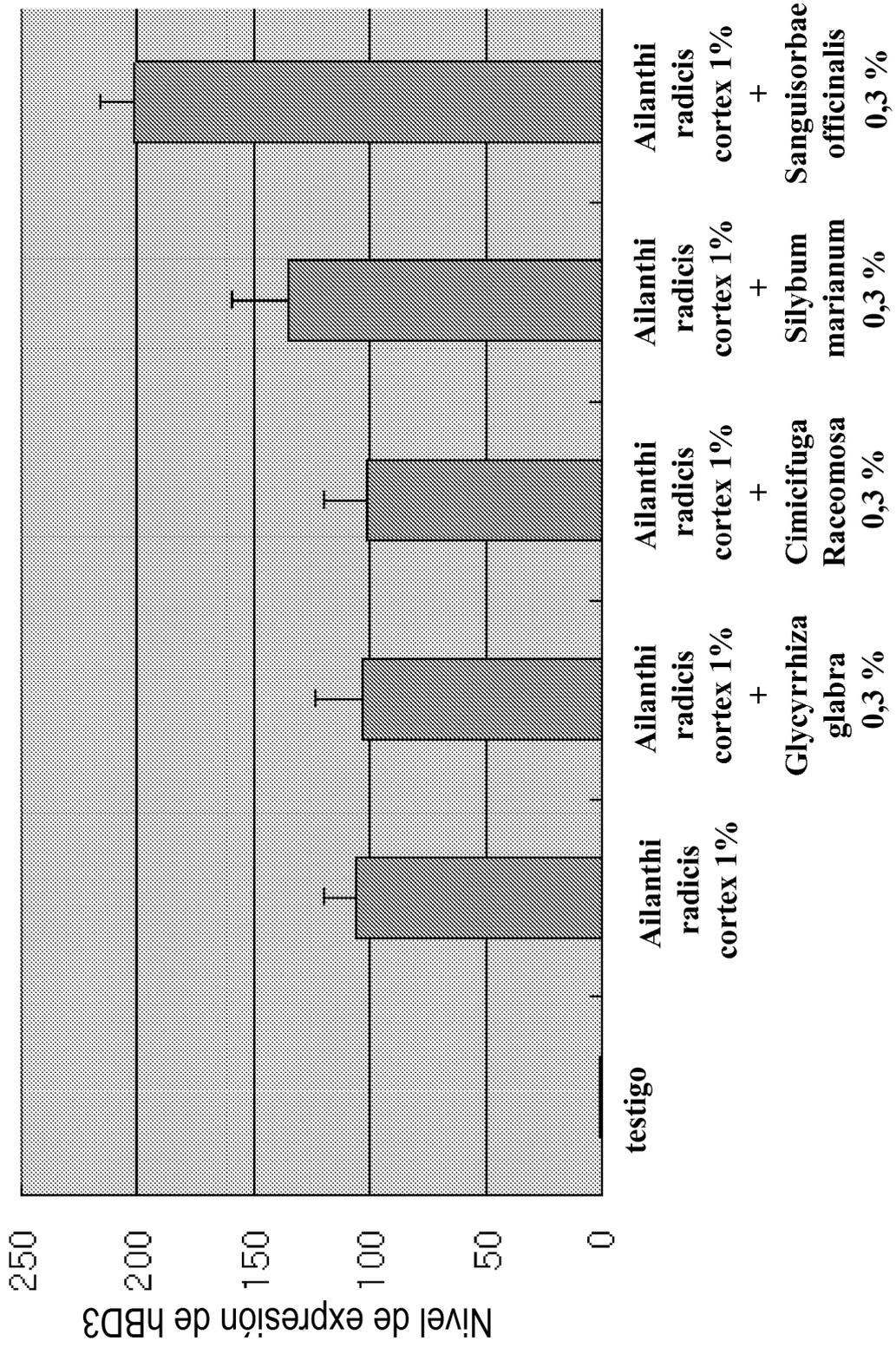


FIG. 15C

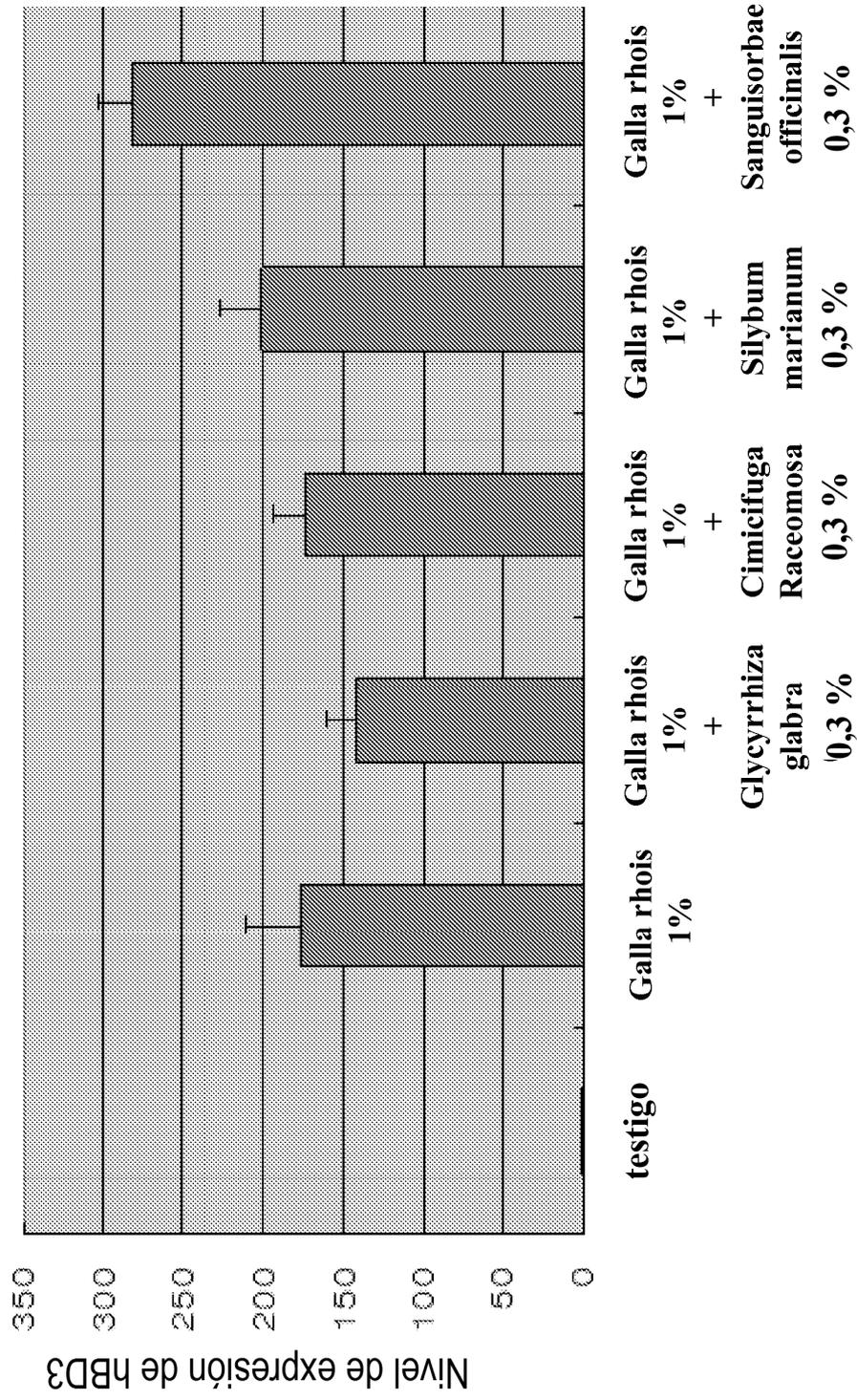
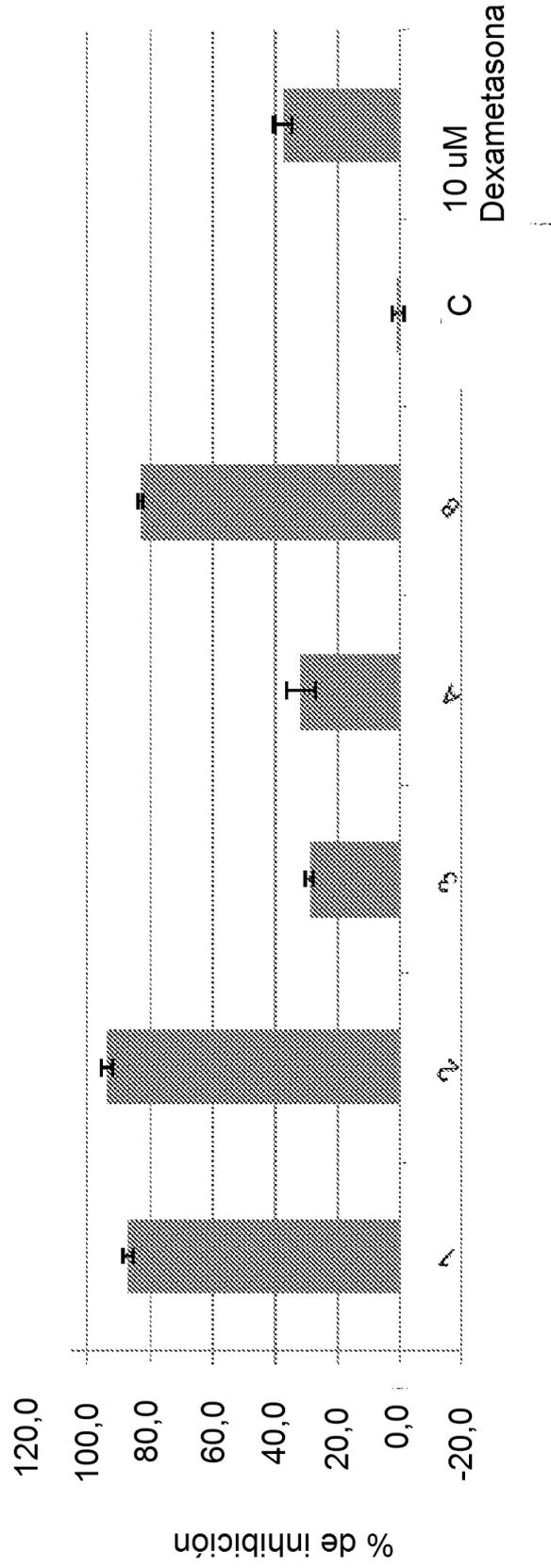


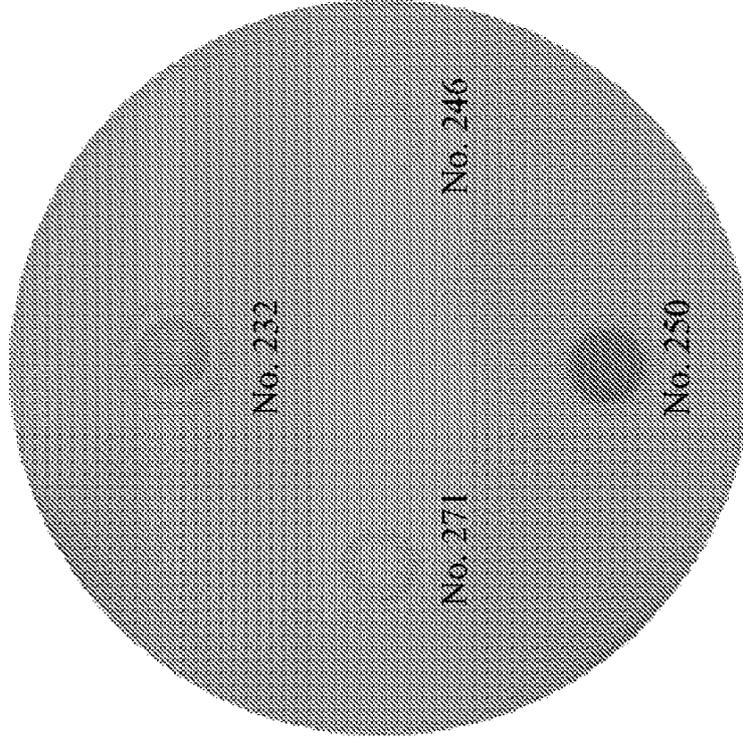
FIG. 16

Ensayo de IL-13



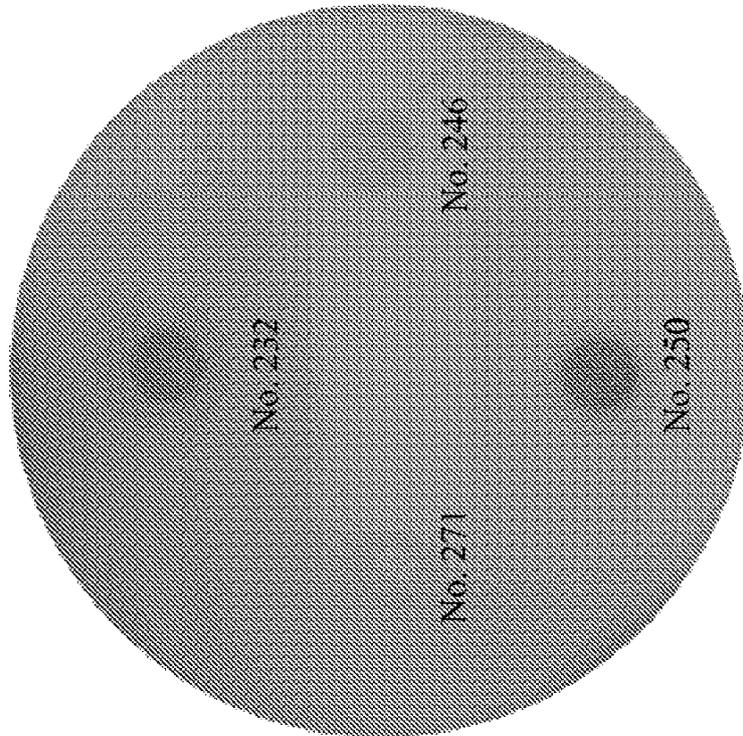
Tratamiento

FIG. 17B



Stap. aureus subsp aureus

FIG. 17A



E. coli resistente a Amp

FIG. 18
COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE *Sanguisorba officinalis* y *Ailanthus altissima*

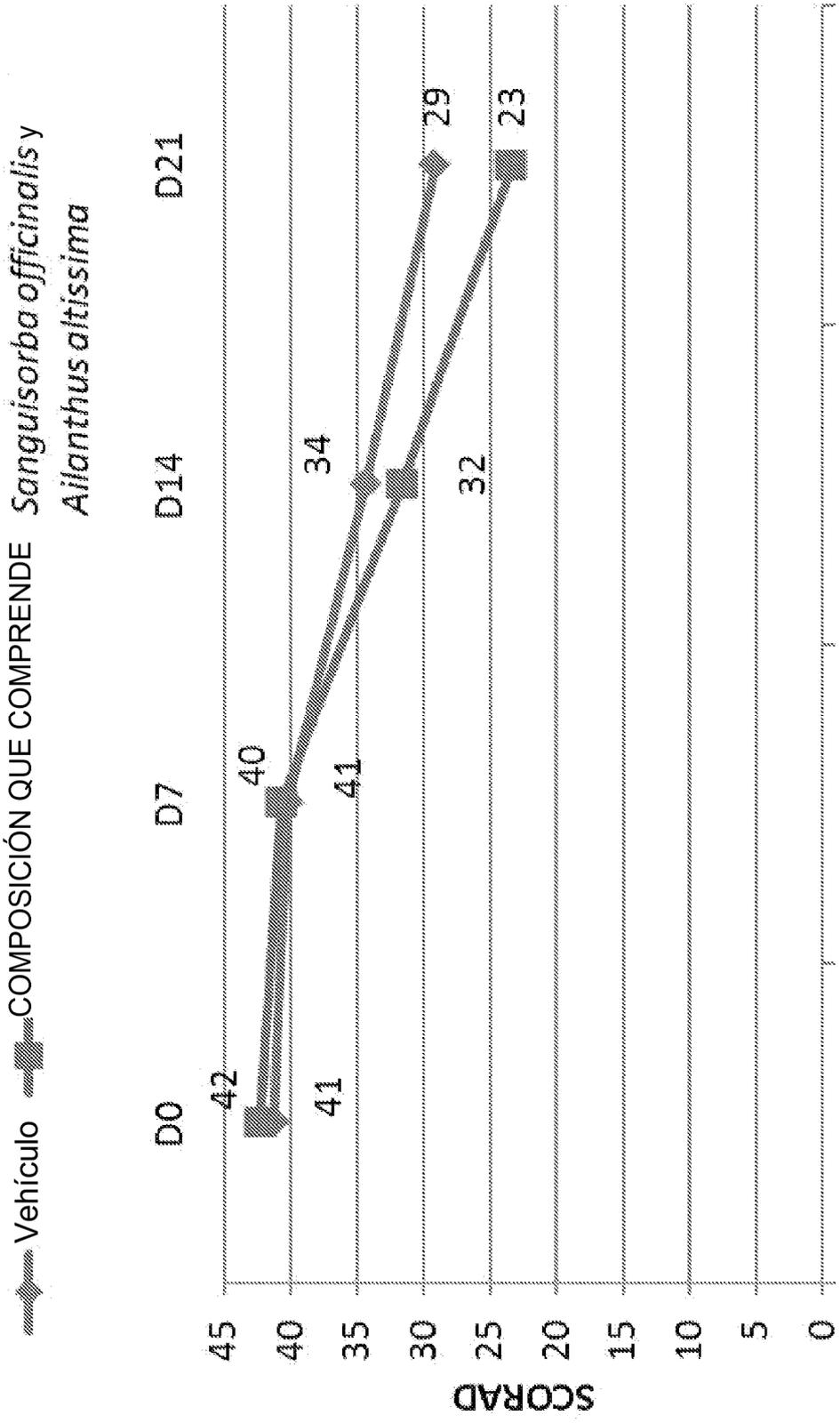


FIG. 19

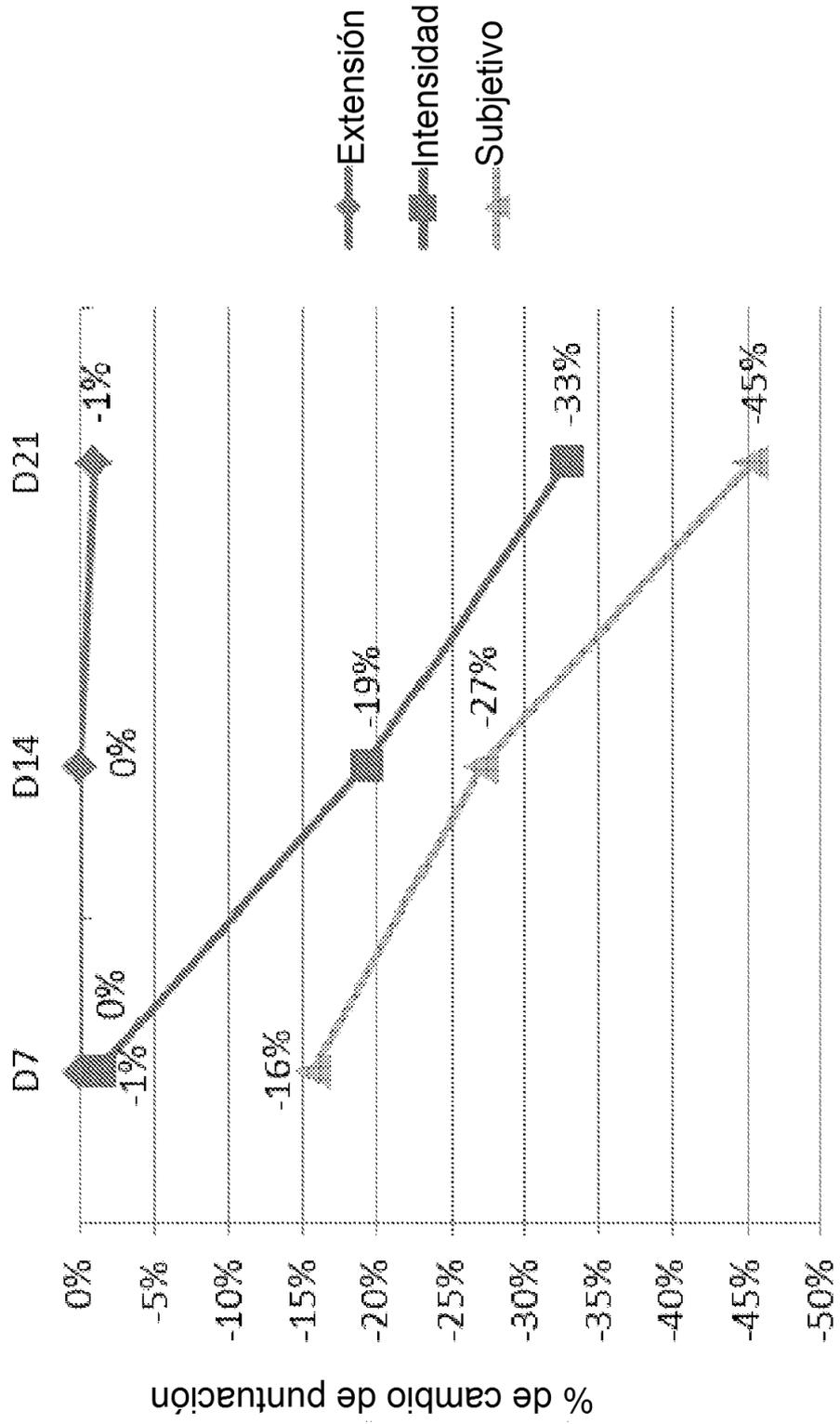


FIG. 20

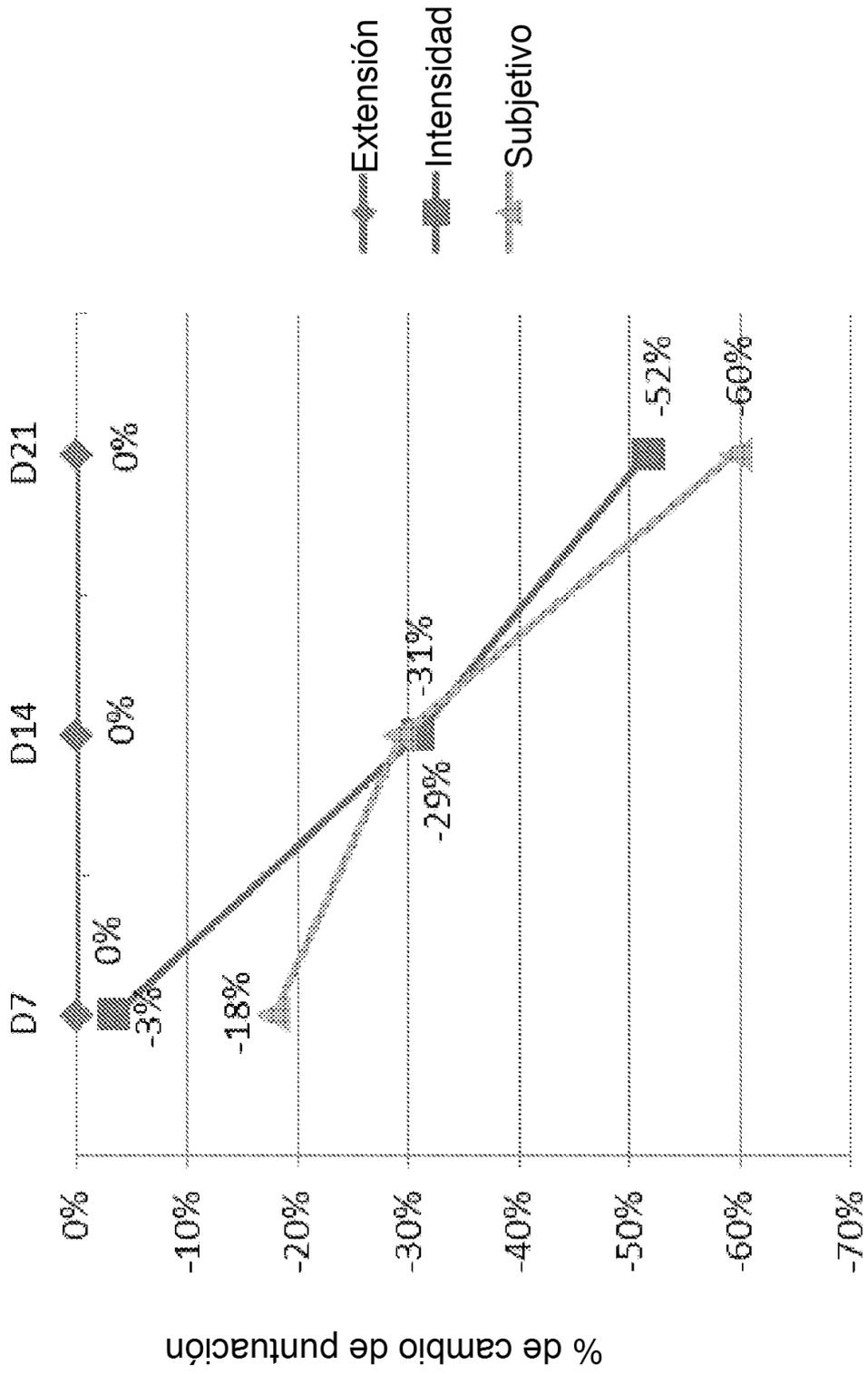


FIG. 21

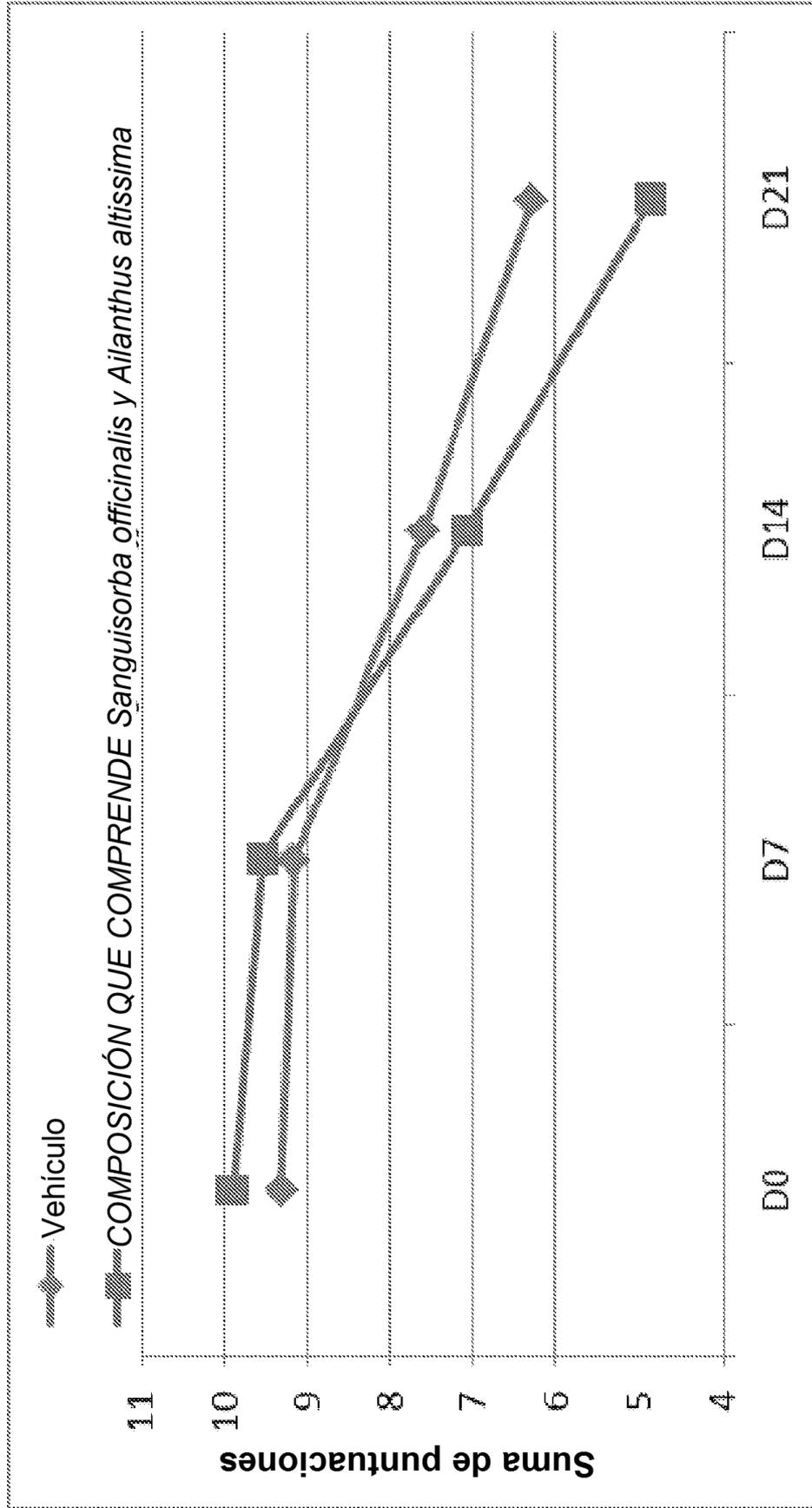


FIG. 22

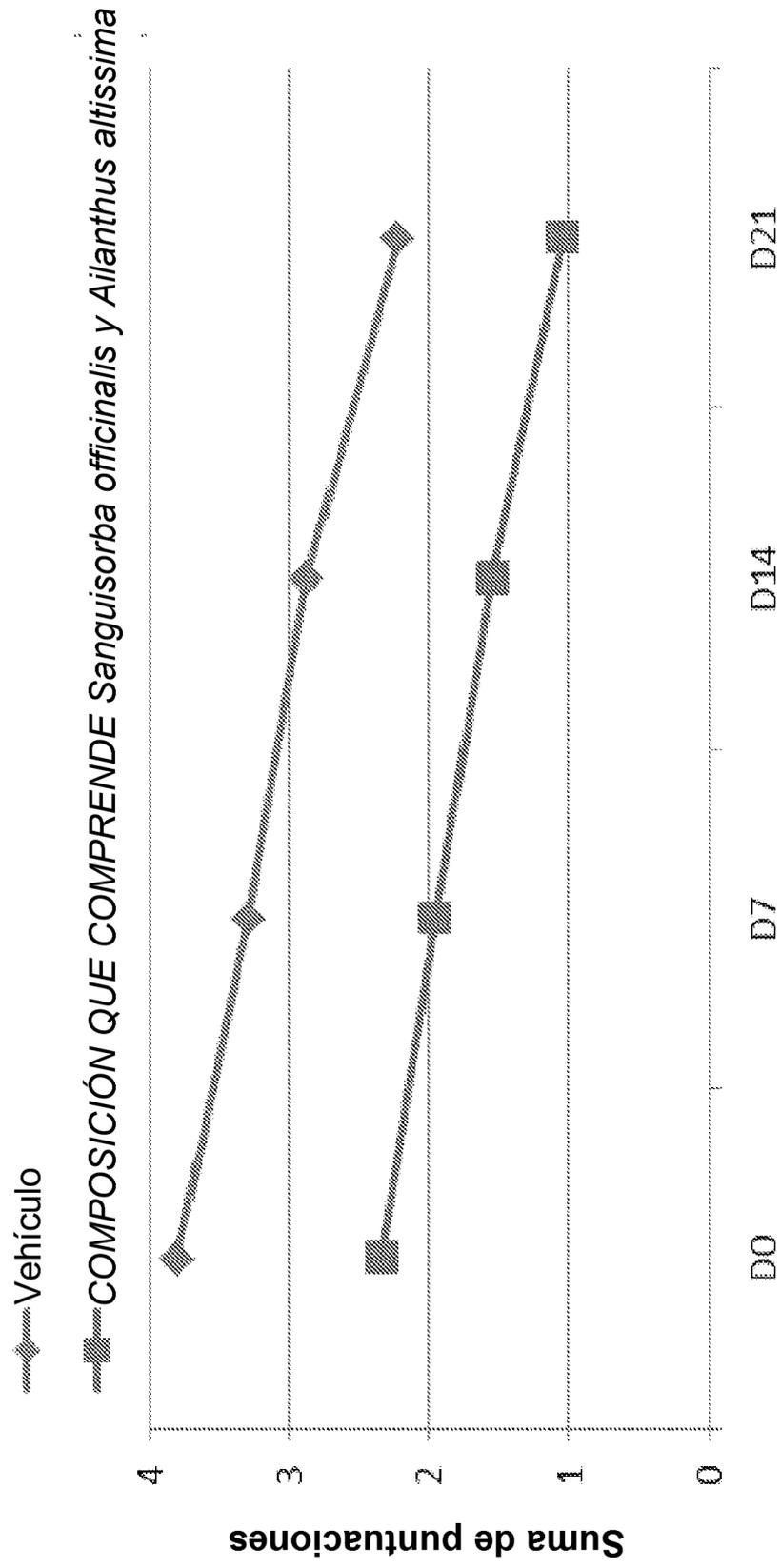


FIG. 23

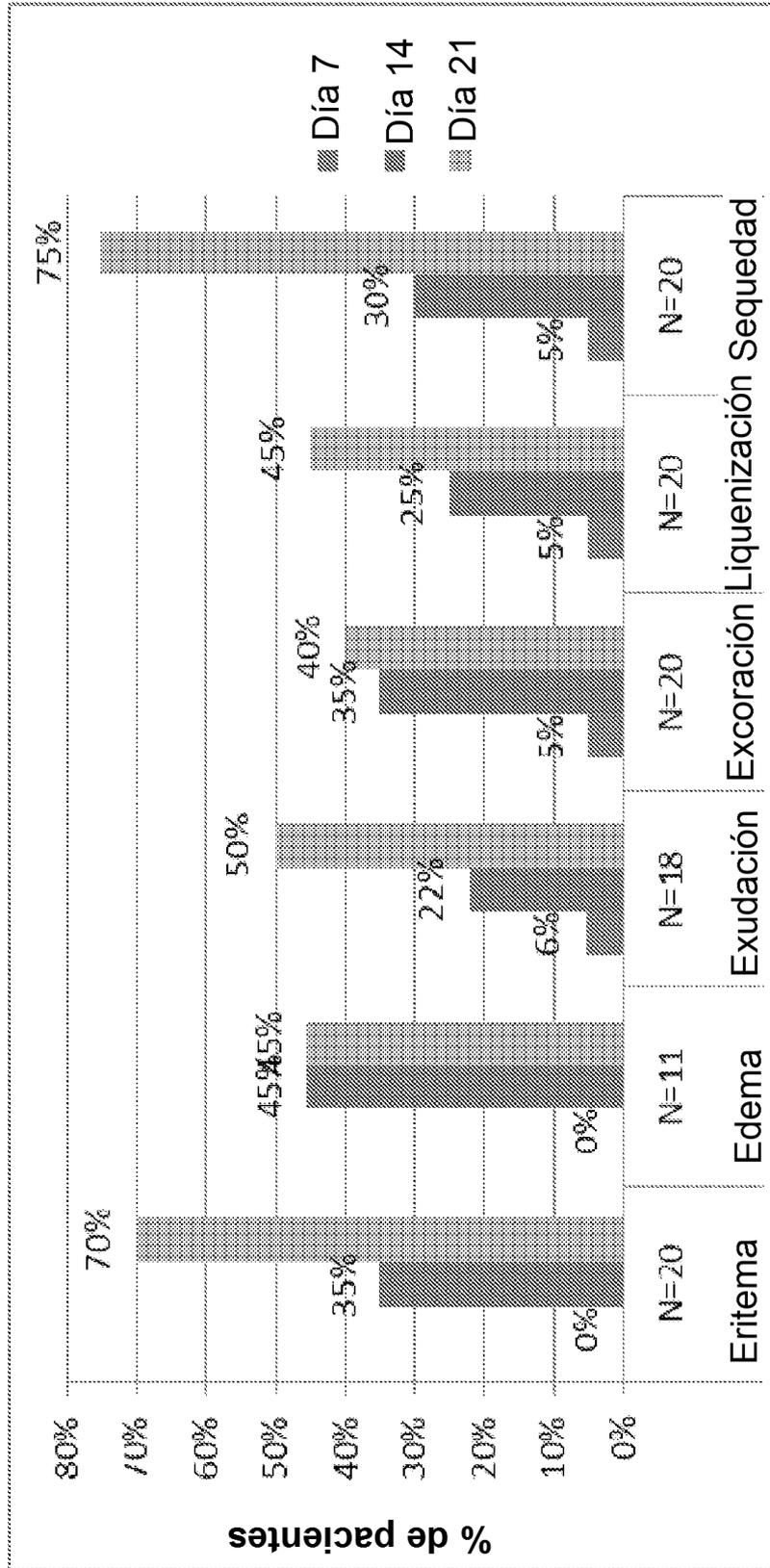


FIG. 24

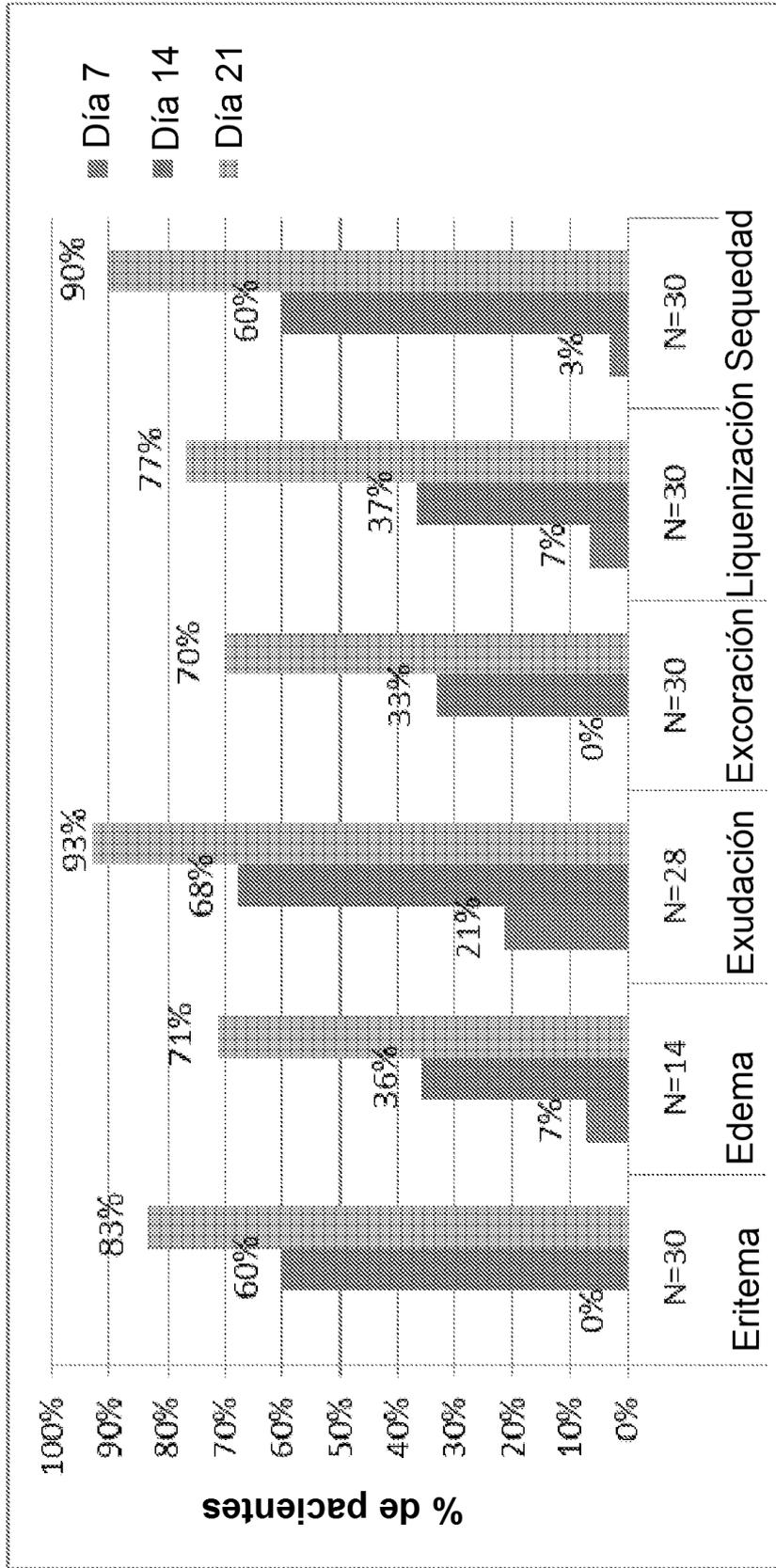


FIG. 25

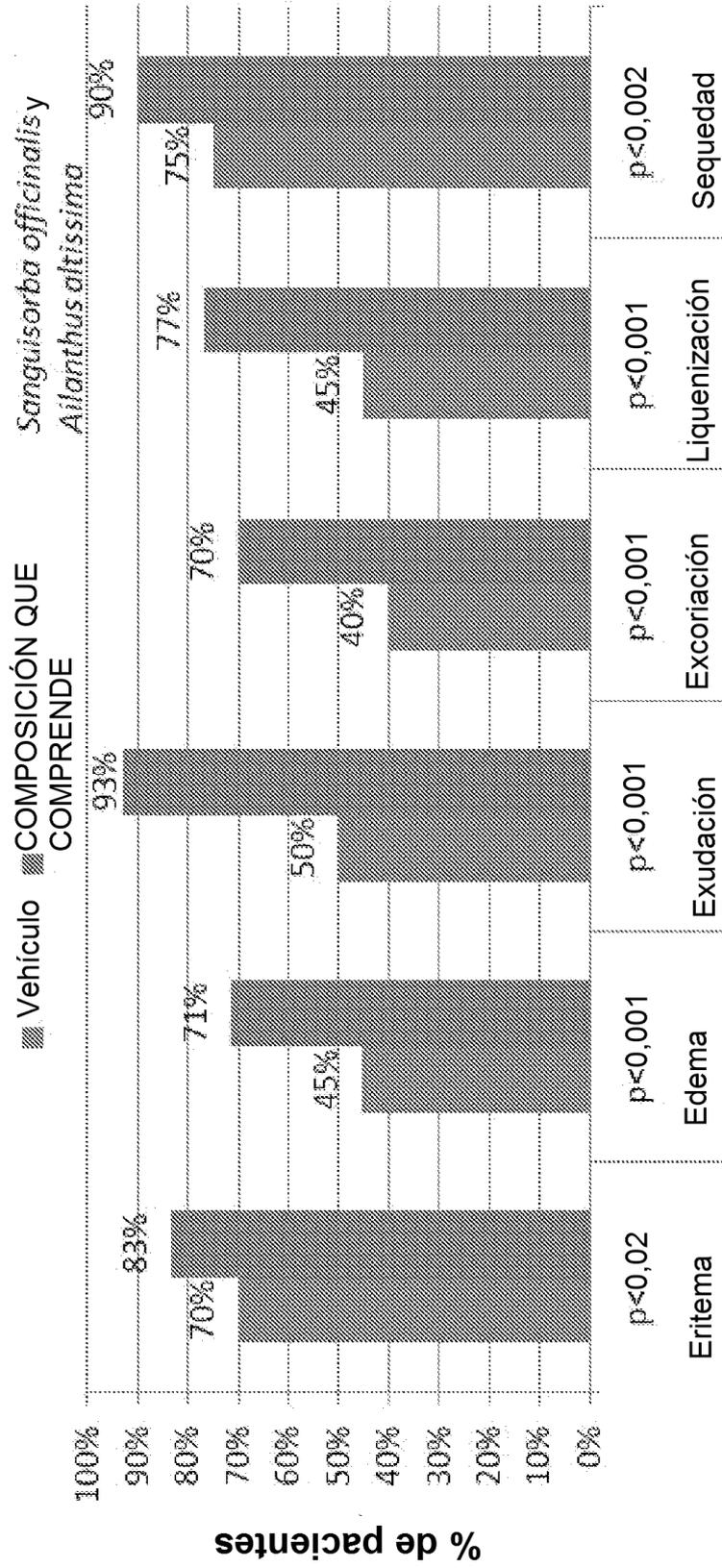


FIG. 26

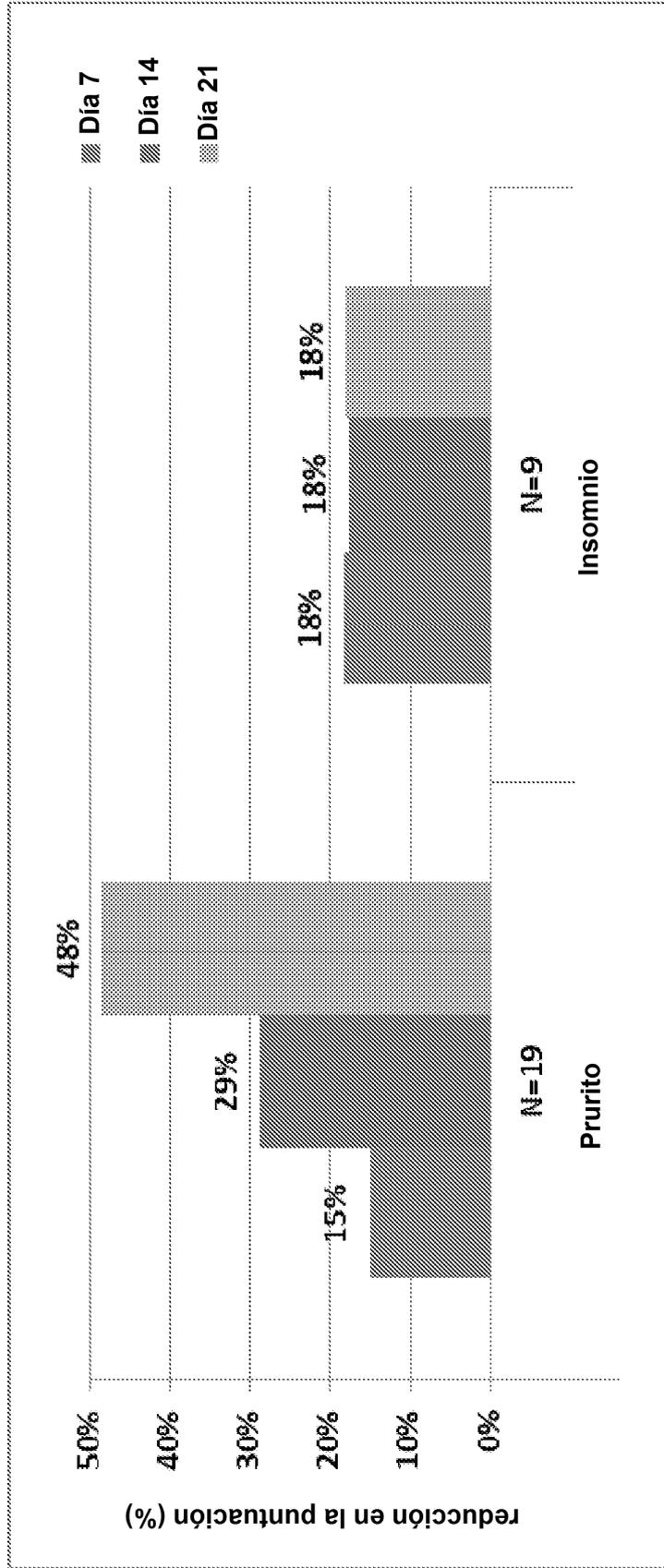


FIG. 27

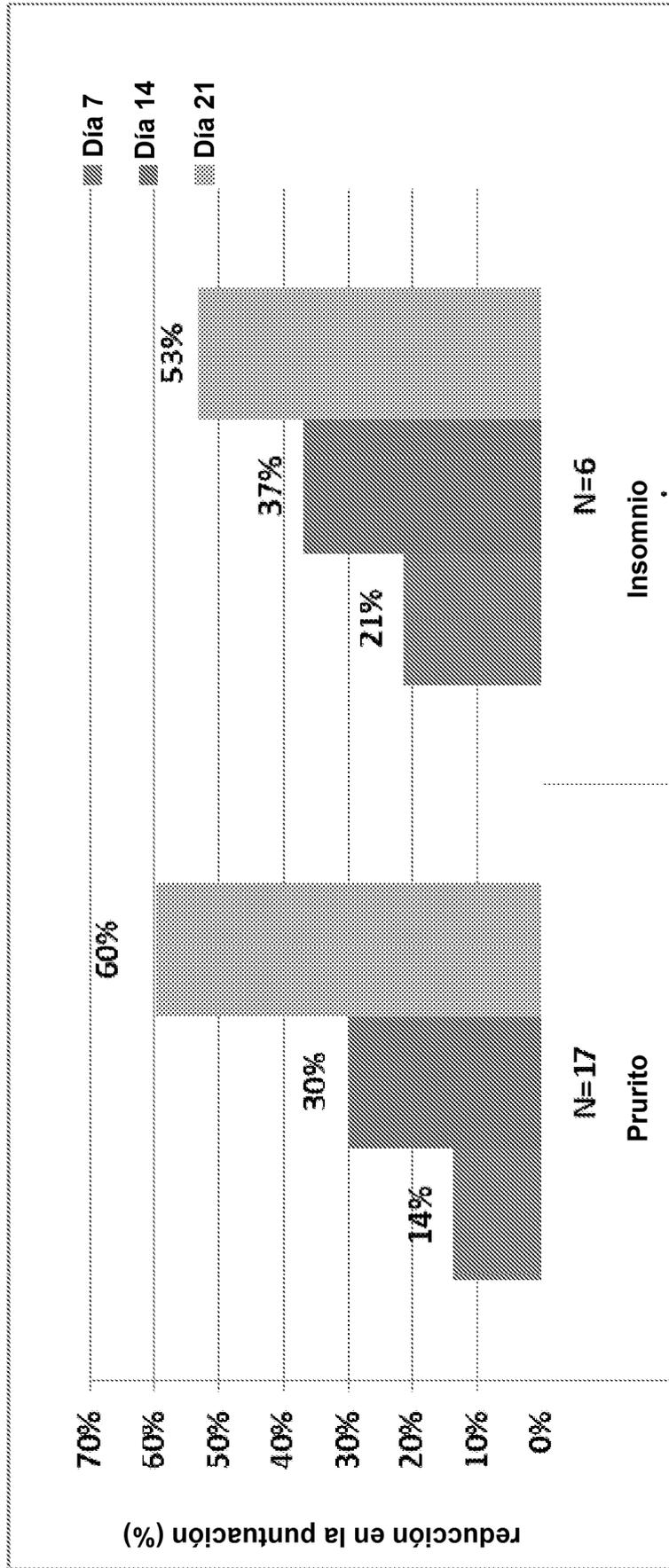


FIG. 28

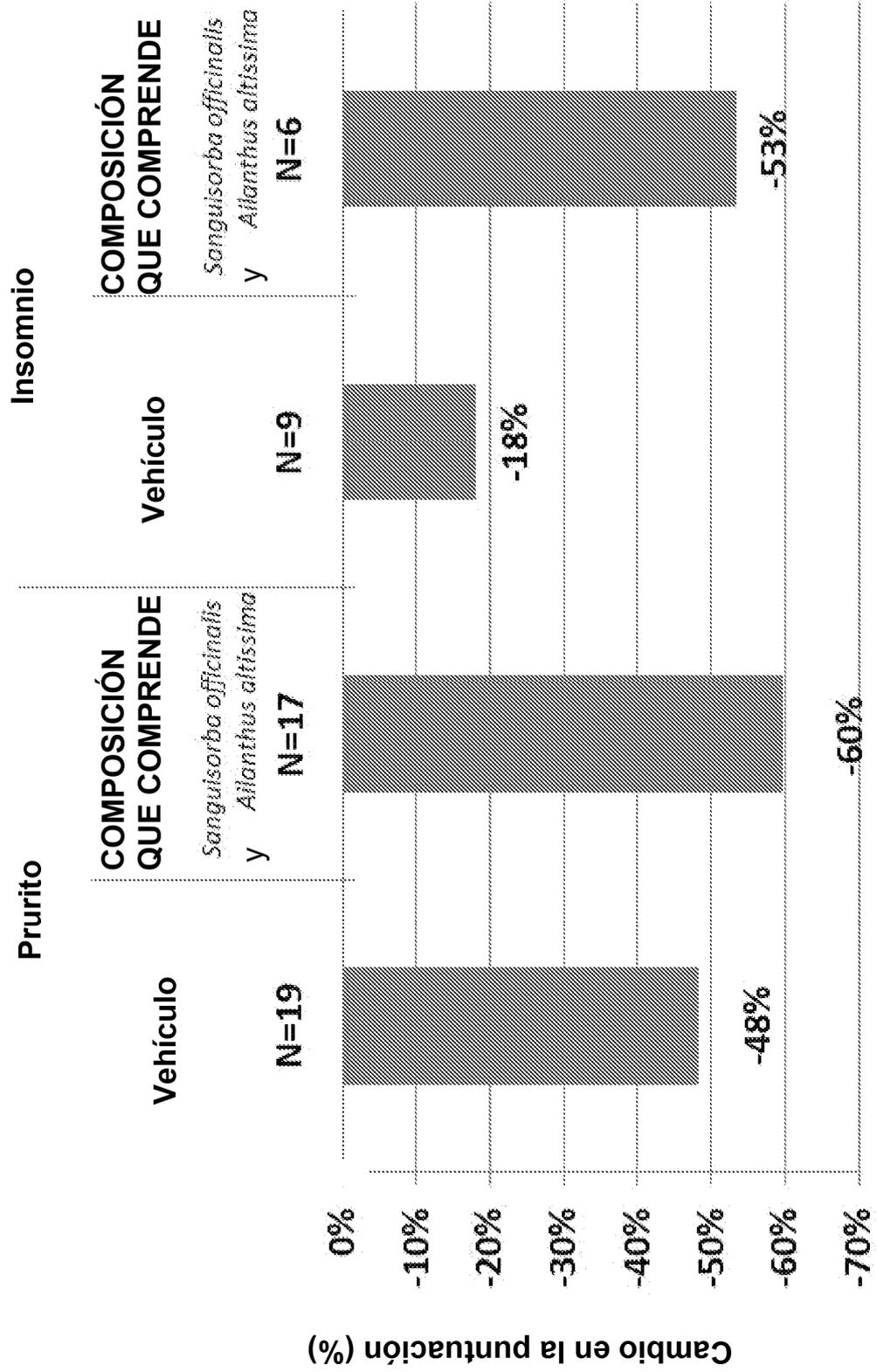


FIG. 29

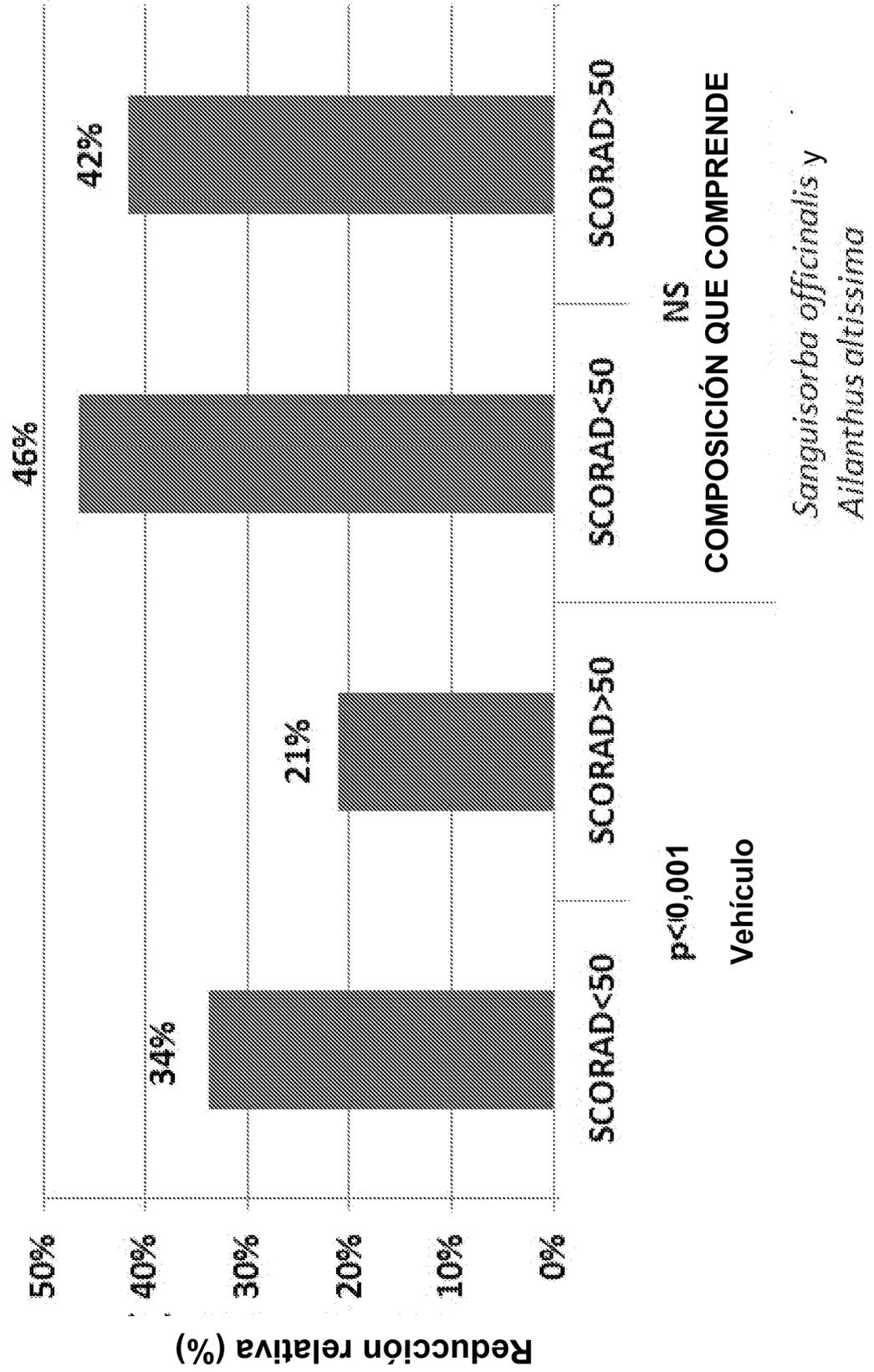


FIG. 30

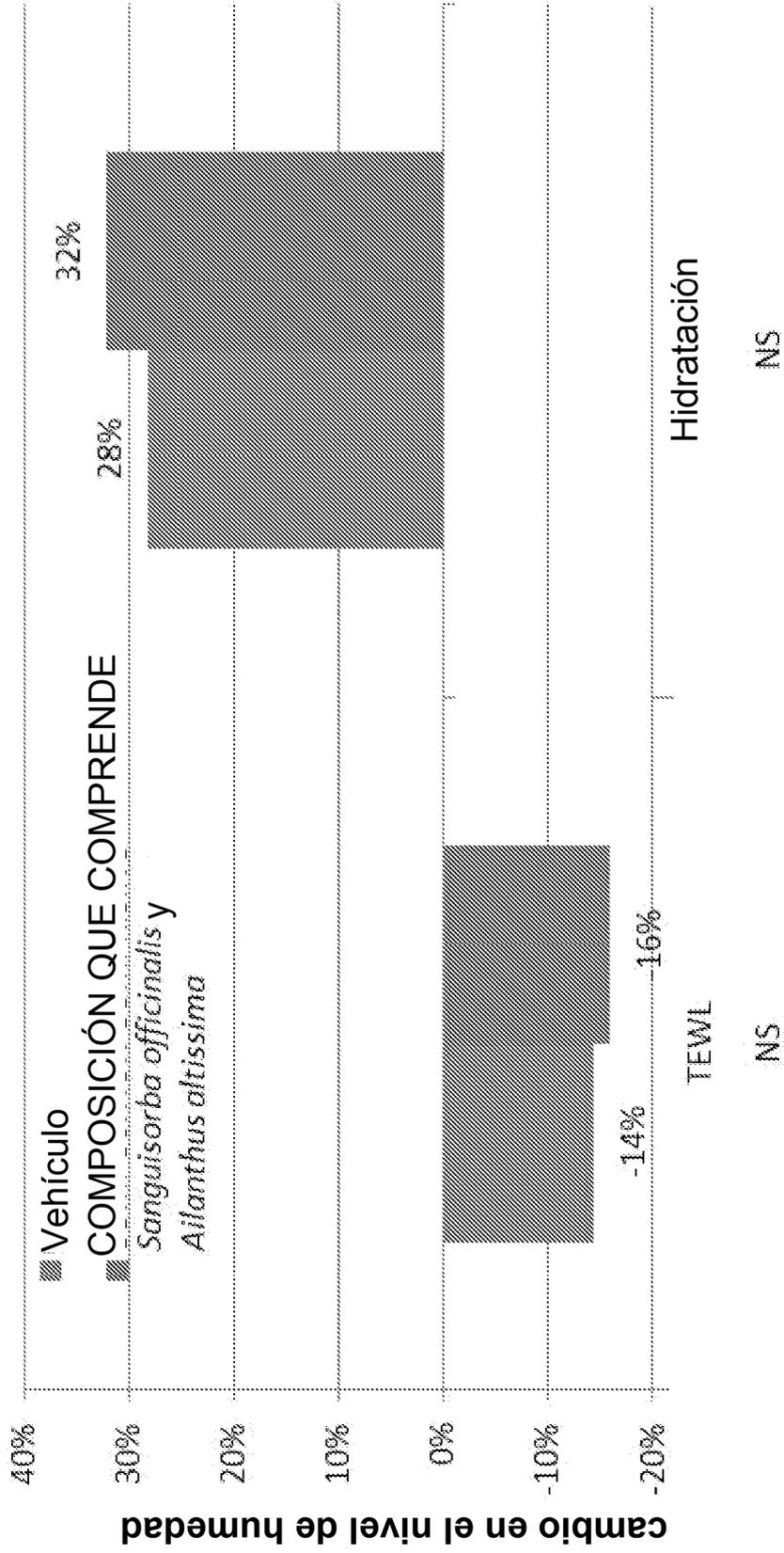


FIG. 31

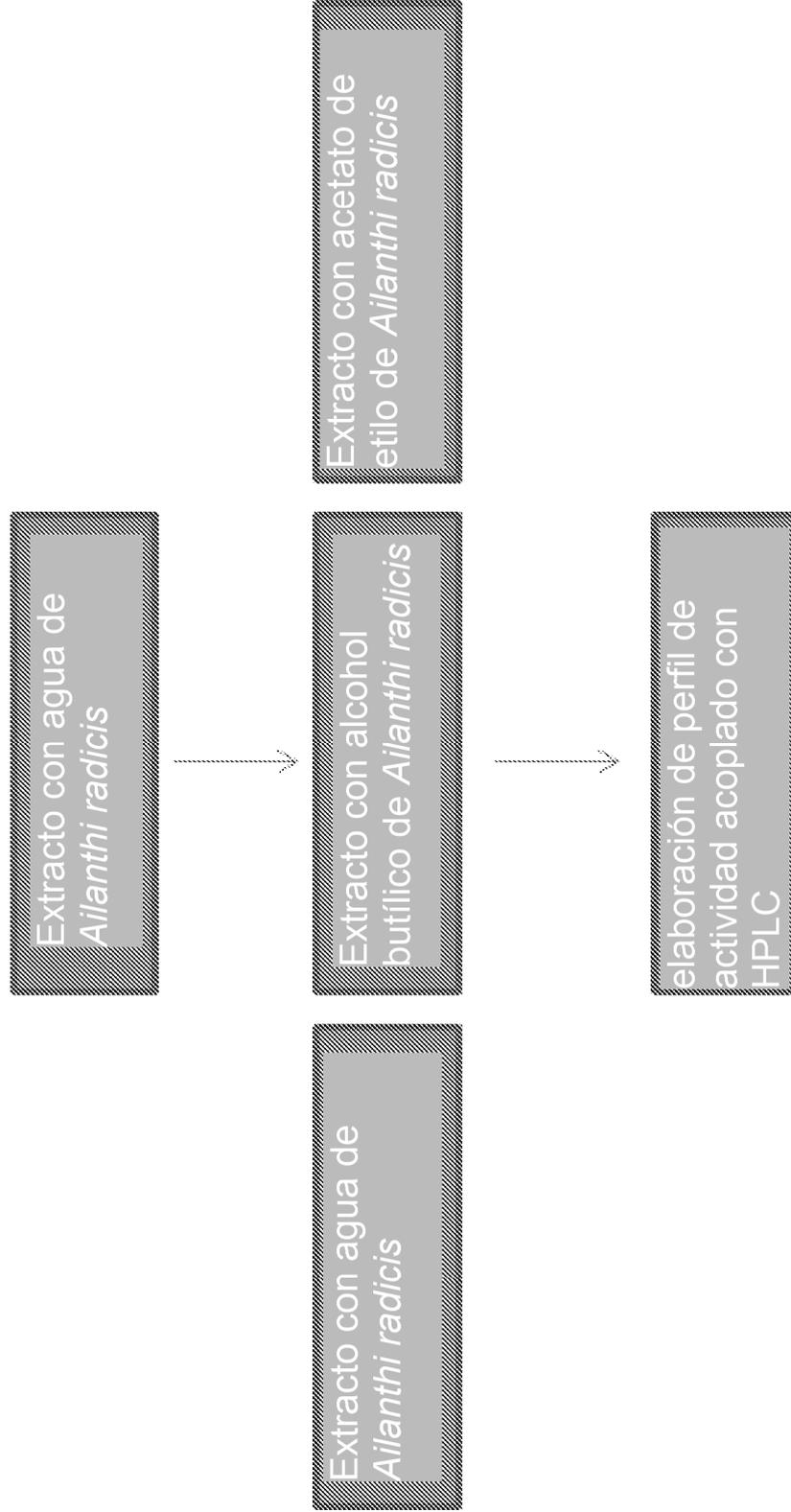


FIG. 32A

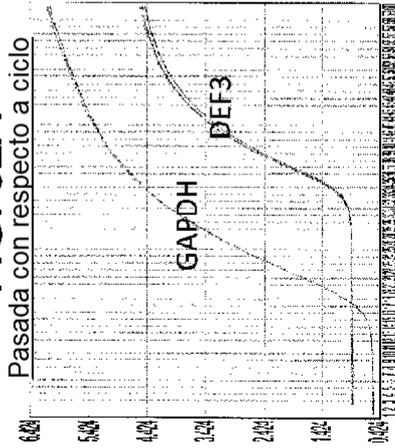


FIG. 32B

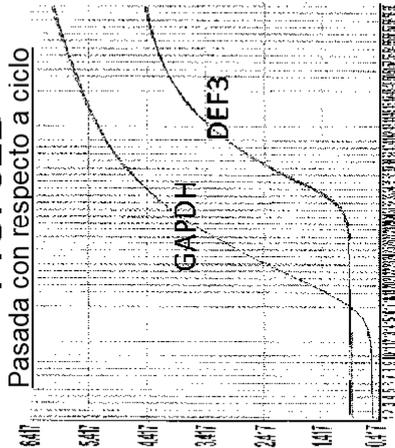


FIG. 32C

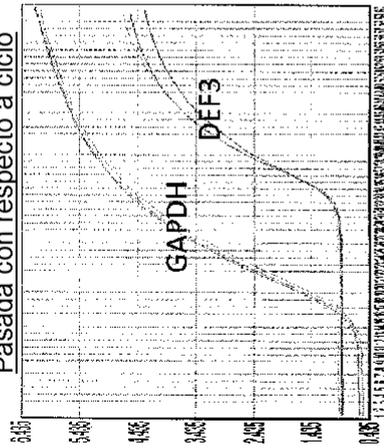


FIG. 32D

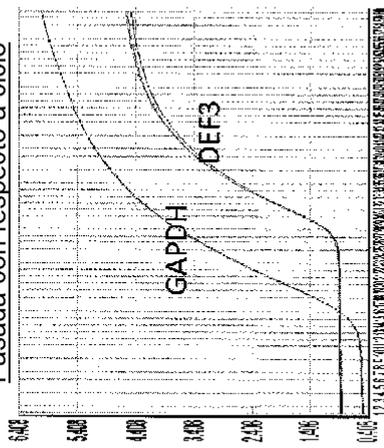


FIG. 32E

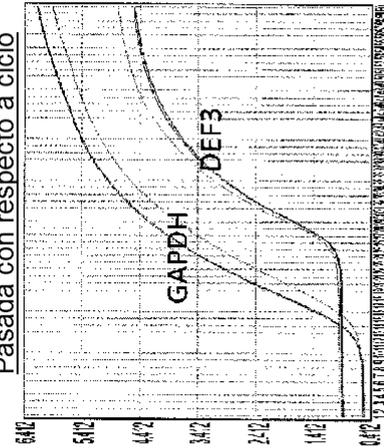


FIG. 33

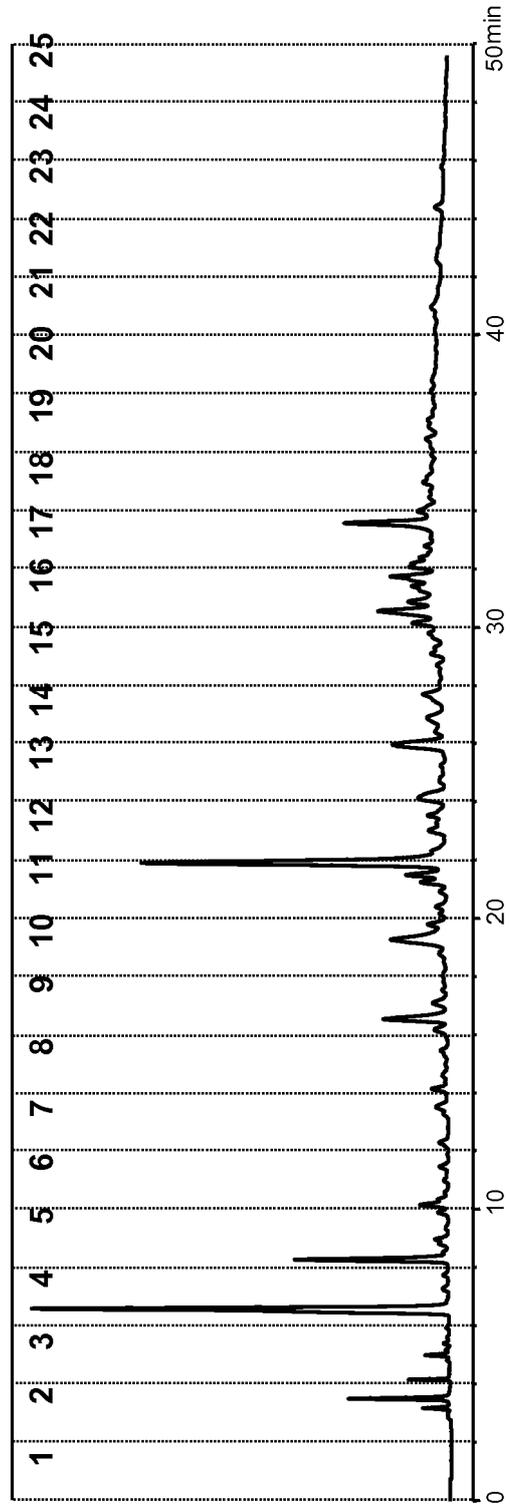


FIG. 34

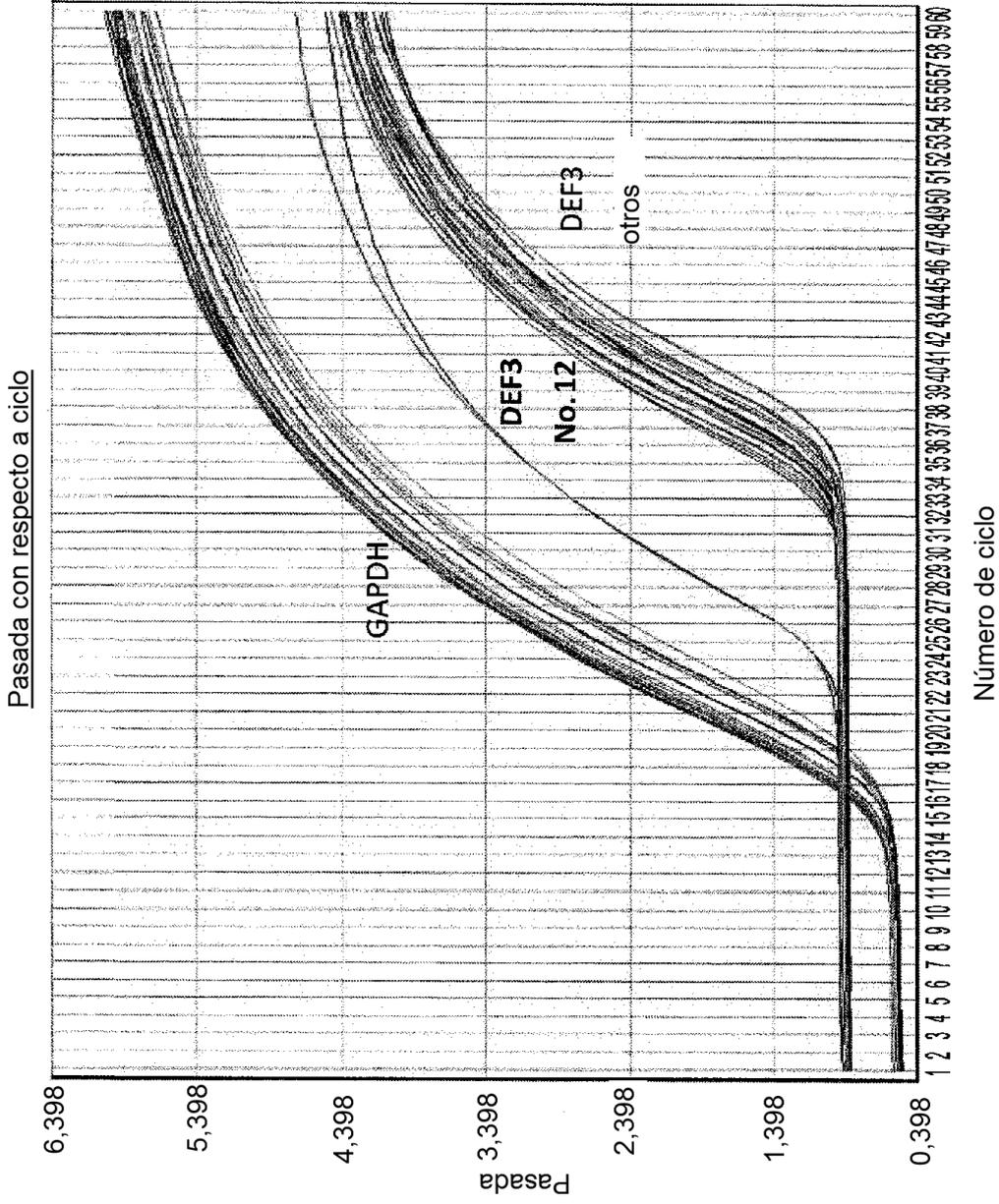


FIG. 35

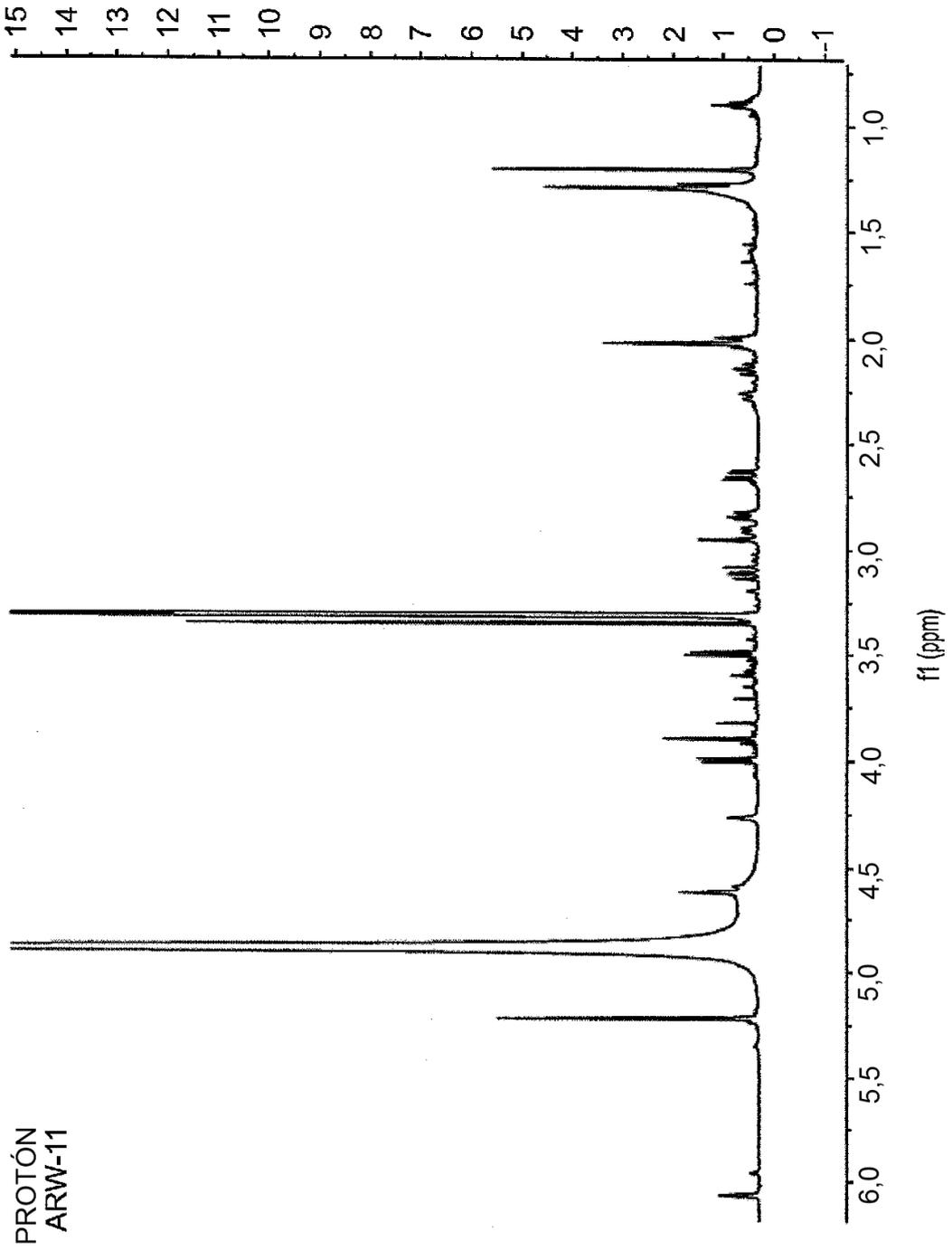


FIG. 36

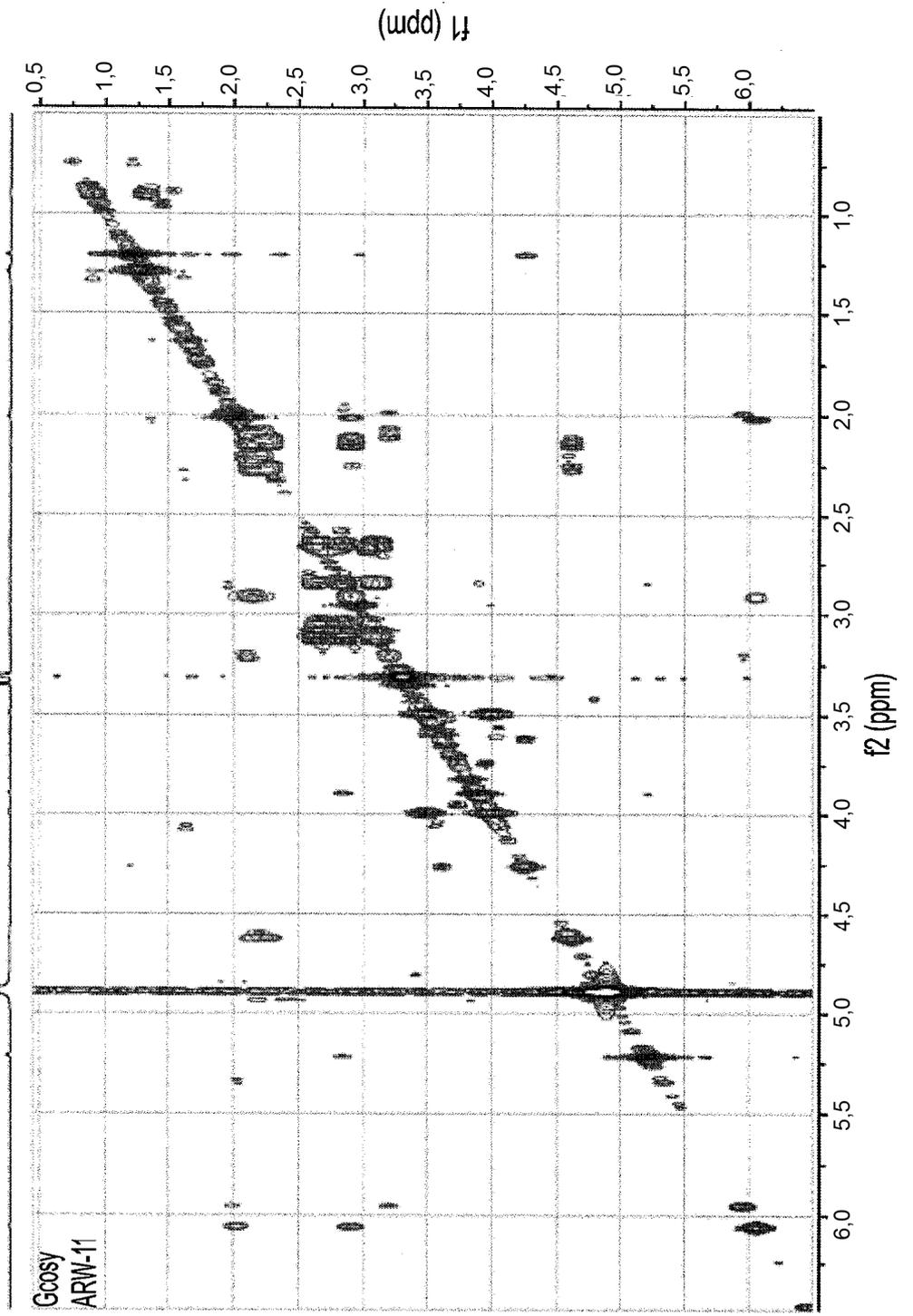


FIG. 37

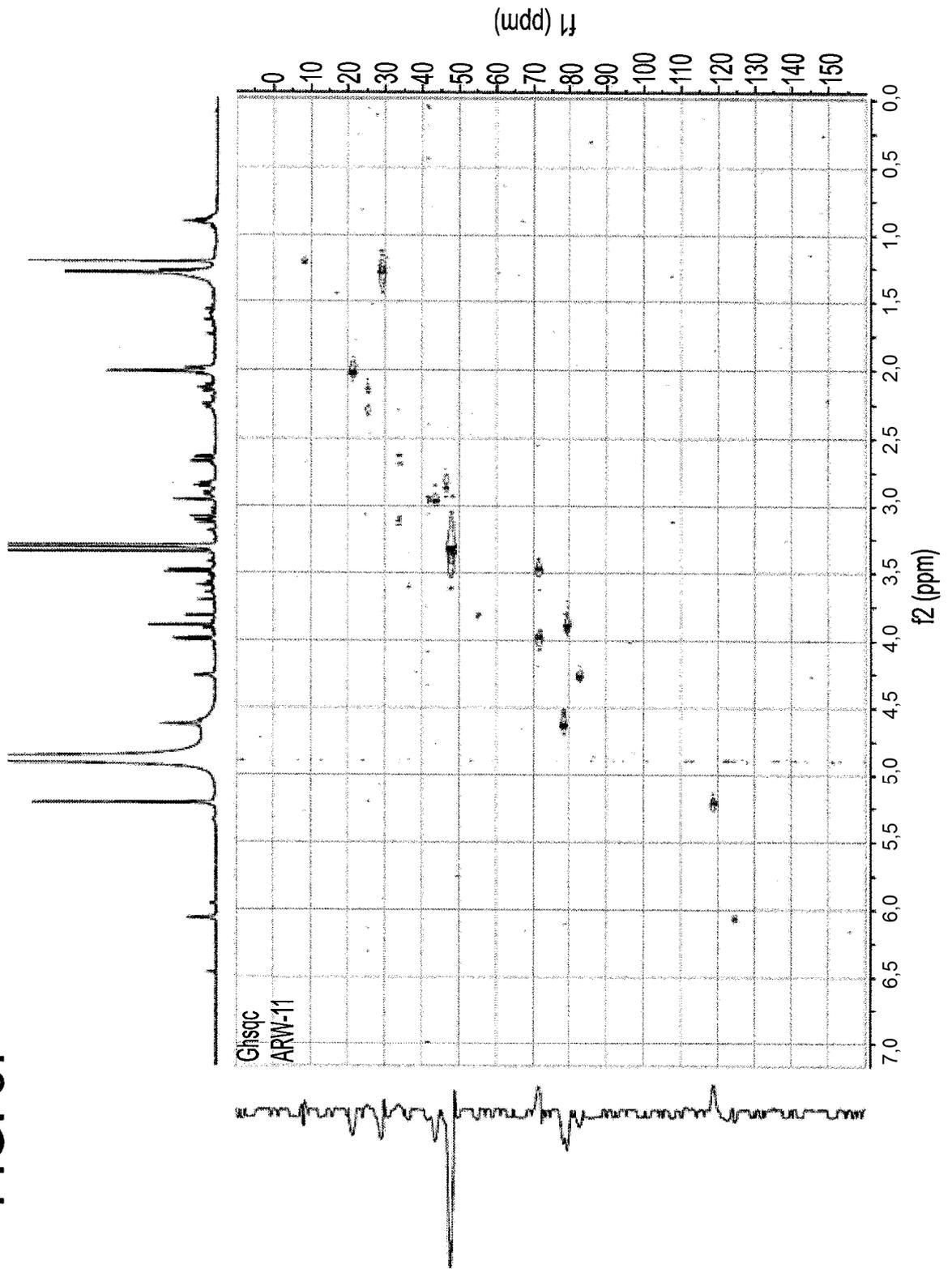


FIG. 38

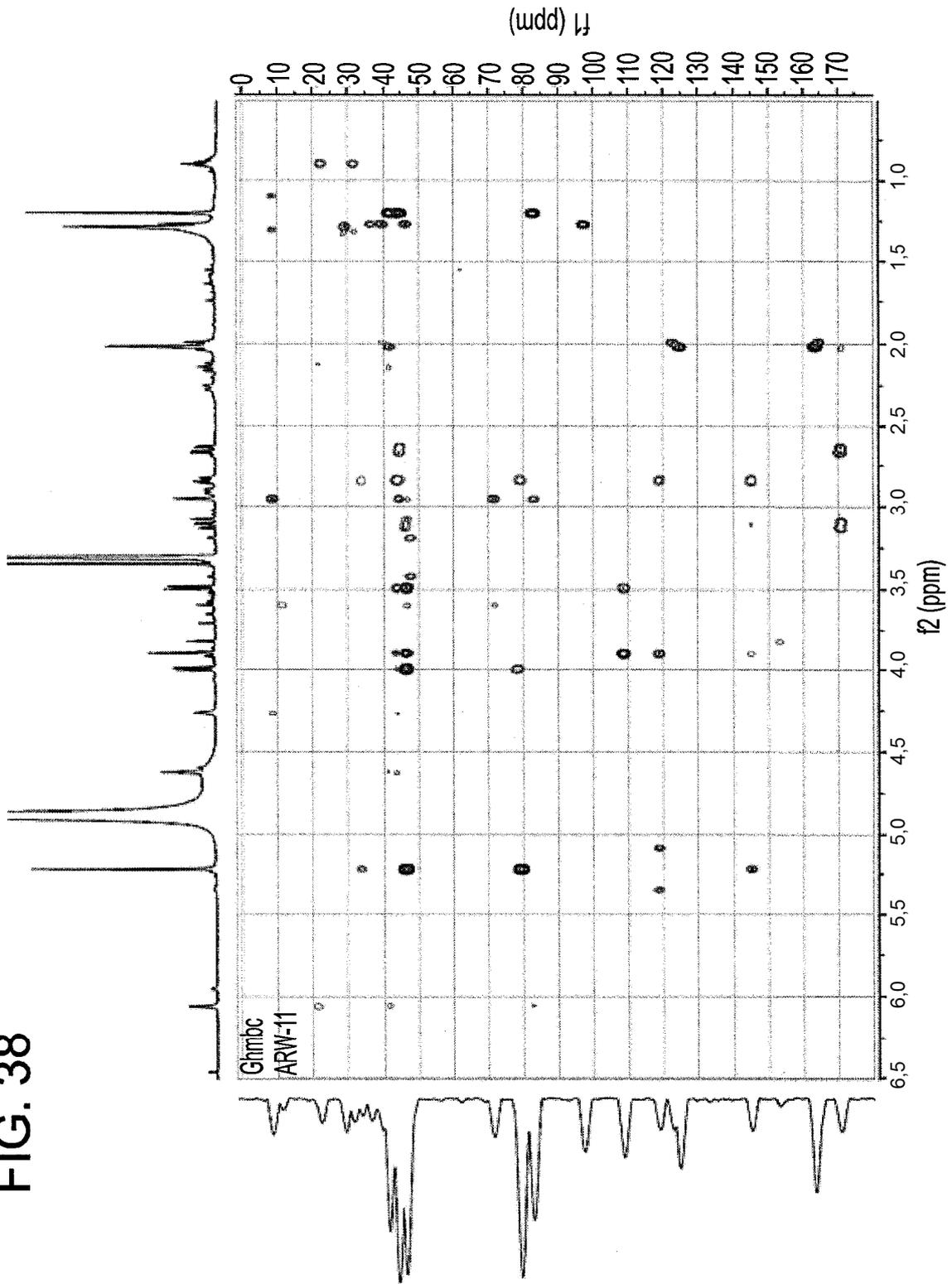


FIG. 39A

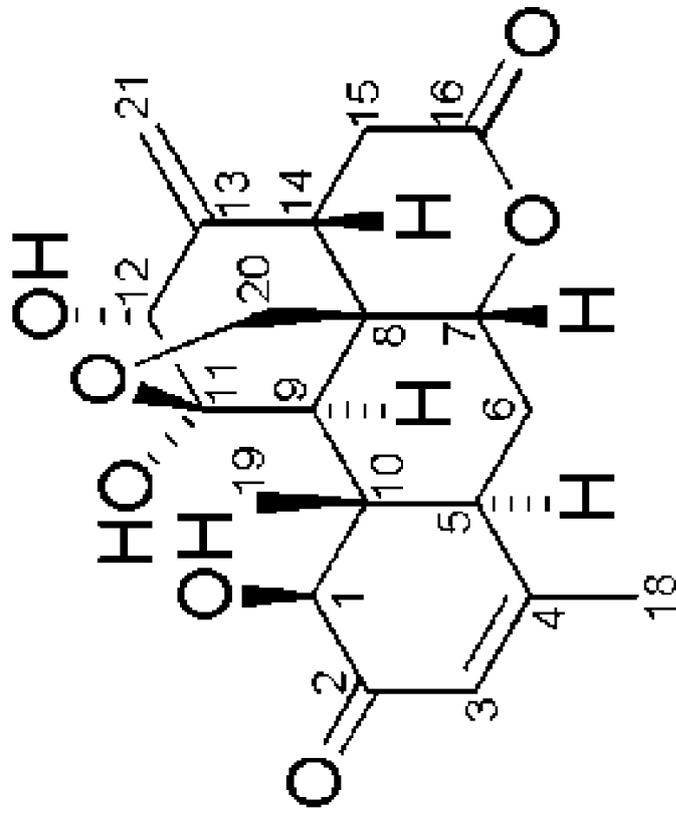


FIG. 39B

